



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

---

# **Determinación de cocaína en cabello como biomarcador de consumo crónico, mediante GC-MS**

**Marian Dalila Vallejo Huertas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá, Colombia  
2012



# **Determinación de cocaína en cabello como biomarcador de consumo crónico, mediante GC-MS**

**Marian Dalila Vallejo Huertas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Toxicología**

Directora:

MSc. Nancy Patiño Reyes

Codirector:

MD MSc. William Giovanni Quevedo Buitrago

Línea de Investigación:

Toxicología Analítica y Toxicología de la Farmacodependencia

Grupo de Investigación:

Sustancias Psicoactivas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología

Bogotá, Colombia

2012



*A mi mamita que ha confiado ciegamente en mí y ha sido mi apoyo incondicional; con su amor me educó y aún sigue haciéndolo; con cada palabra, con cada abrazo, con cada beso, me da día a día todo de sí.*



## Agradecimientos

A Dios, porque con Él, todo ha sido posible.

A mi madre, Idalba Huertas y, a mi familia, quienes han depositado su confianza en mí, en cada tarea que he emprendido.

A Nancy Patiño y William Quevedo, docentes de la Universidad Nacional, por la dirección y codirección respectivas y, constante acompañamiento en el desarrollo de esta tesis.

A Jairo Téllez, coordinador de la Maestría en Toxicología, por permitirme pertenecer al Grupo de Sustancias Psicoactivas, el cual dirige.

Al Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina, por permitirme trabajar en el Laboratorio de Toxicología, aportar los equipos, materiales y reactivos necesarios en el desarrollo experimental de este trabajo.

A la Dirección de Investigación Sede Bogotá (DIB) en conjunto con la Facultad de Medicina, quienes mediante la *Convocatoria para el estímulo a la investigación a través de proyectos y trabajos de investigación en los posgrados de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Apoyo en la Investigación en Salud. Facultad de Medicina y Dirección de Investigación Sede Bogotá 2011*, apoyaron esta investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, que me abrió sus puertas para convertirse en mi segundo hogar.

A la Comunidad Terapéutica Amigoniana San Gregorio, bajo la dirección del Padre Jacinto Guarín, por autorizar la participación de las integrantes de la Casa Girasol en la toma de muestras de cabello.

A Adriana Ruiz y Mónica Bejarano, químicas farmacéuticas, quienes participaron en el desarrollo de la parte inicial de esta investigación, como trabajo de grado para optar a su título profesional.

A mis amigos y todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron para alcanzar esta meta.





## Resumen

Conocer el consumo crónico de drogas de abuso es posible, mediante la búsqueda de las mismas en una matriz biológica como el pelo, la cual viene siendo utilizada cada vez con mayor frecuencia por los laboratorios de toxicología. Dado que en el país aún no es un análisis de rutina, se da un primer paso en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, con la detección y cuantificación de cocaína a partir de cabello, por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, para lo cual se optimizó y validó una metodología analítica adecuada. Dicha metodología resultó selectiva, precisa, exacta, lineal en el rango de concentraciones de 0.69 a 60.00 ng/mg, con un límite de detección de 0.19 ng/mg y un límite de cuantificación de 0.69 ng/mg, una recuperación del 98% y, una estabilidad del analito extraído de máximo 6 horas. Esta metodología se aplicó mediante el análisis de muestras obtenidas de una población de jóvenes consumidores de diferentes drogas lícitas e ilícitas, en proceso de rehabilitación. Se tomó una extensión de cabello total de 9 cm para conocer la posible historia de consumo durante los últimos 9 meses aproximadamente, fraccionando cada muestra en tres segmentos. Los resultados cuantitativos revelaron que un 15% de los participantes del estudio no consumieron cocaína durante el período evaluado, mientras que el 85% restante, consumió la droga en algún momento de dicho tiempo; de este último porcentaje correspondiente a los consumidores, el 70% usó cocaína durante el trimestre inmediatamente anterior a la toma de la muestra, el 78% en el segundo trimestre (segmento intermedio), el 57% en el tercer trimestre representado en el segmento distal y, el 30% en el total del tiempo valorado, es decir, la droga estuvo presente en las tres divisiones del cabello.

**Palabras clave:** Cocaína, cabello, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## Abstract

Knowing the chronic use of abuse drugs is possible, by finding them in a biological matrix such as hair, which is being used with increasing frequency by toxicology laboratories. Since the country is still not a routine analysis, there is a first step in the Laboratory of Toxicology, Faculty of Medicine, National University of Colombia, with the detection and quantification of cocaine from hair chromatographic gases mass spectrometry, for which was optimized and validated analytical methodology appropriate. This methodology was selective, precise, accurate, linear in the concentration range of 0.69 a 60.00 ng/mg with a detection limit of 0.19 ng/mg and a limit of quantification of 0.69 ng/mg, a recovery of 98% and, stability of the extracted analyte from up to 6 hours. This methodology was applied by analyzing samples obtained from a population of young consumers in different legal and illegal drugs in the rehabilitation process. It took a hair extension total of 9 cm to know the possible history of consumption over the last 9 months or so, dividing each sample into three segments. The quantitative results revealed that 15% of study participants did not used cocaine during the evaluation period, while the remaining 85% used the drug at some point in that time; the last share of consumers, 70% used cocaine during the quarter immediately preceding the sampling, 78% in the second quarter (middle segment), 57% in the third quarter represented in the distal segment and 30% in total valued time, ie, the drug was present in all three divisions of the hair.

**Keywords:** Cocaine, hair, gas chromatography – mass spectrometry.

# Contenido

	Pág.
<b>Resumen .....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XIV</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XV</b>
<b>Lista de cuadros.....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas.....</b>	<b>XVII</b>
Símbolos.....	XVII
Subíndices .....	XVII
Abreviaturas .....	XVIII
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Planteamiento del Problema.....</b>	<b>5</b>
1.1    Objetivos .....	6
1.1.1    Objetivo General.....	6
1.1.2    Objetivos Específicos.....	6
<b>2. Marco Conceptual .....</b>	<b>7</b>
2.1    La matriz: Pelo .....	7
2.1.1    Estructura y crecimiento del cabello.....	7
2.1.2    Pigmentación.....	9
2.1.3    Mecanismos de incorporación de drogas en el cabello .....	10
2.1.4    Estabilidad de las drogas en el cabello .....	13
2.1.5    Aplicaciones del análisis de drogas en cabello .....	13
2.2    El analito: Cocaína .....	16
2.2.1    Toxicocinética .....	17
2.2.2    Toxicodinamia .....	19
2.2.3    Cinética de eliminación de la Cocaína a través del cabello .....	20
2.2.4    Uso de múltiples sustancias e interacciones .....	21
2.3    La técnica analítica: GC-MS.....	21
2.3.1    Cromatografía de gases (GC).....	22
2.3.2    Espectrometría de masas (MS) .....	23
2.3.3    Validación de una metodología analítica.....	24
2.4    La metodología analítica: Determinación de cocaína en cabello .....	26

2.4.1	Recolección de la muestra .....	26
2.4.2	Análisis de porosidad del cabello .....	27
2.4.3	Análisis de cabello por segmentos .....	27
2.4.4	Descontaminación de la muestra .....	28
2.4.5	Desintegración y extracción de la muestra .....	28
2.4.6	Criterios para análisis por espectrometría de masas .....	29
2.4.7	Criterios para obtener un análisis en cabello positivo .....	29
2.4.8	Relación entre la dosis consumida de la droga y la concentración encontrada en el cabello.....	30
<b>3.</b>	<b>Metodología.....</b>	<b>33</b>
3.1	Tipo de investigación .....	33
3.2	Ubicación geográfica .....	33
3.3	Población de estudio.....	33
3.4	Consideraciones éticas.....	34
3.4.1	Tipo de investigación.....	34
3.4.2	Procedimiento para la toma del consentimiento informado.....	34
3.4.3	Texto completo del formulario del Consentimiento Informado .....	34
3.4.4	Formato de Toma de Muestra .....	34
3.5	Materiales y Métodos .....	35
3.5.1	Equipos .....	35
3.5.2	Reactivos .....	36
3.5.3	Optimización de la metodología analítica .....	36
3.5.4	Validación de la metodología analítica .....	41
3.5.5	Aplicación de la metodología analítica.....	41
<b>4.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>43</b>
4.1	Validación de la metodología analítica .....	43
4.1.1	Selectividad .....	43
4.1.2	Precisión .....	45
4.1.3	Linealidad y Rango.....	46
4.1.4	Límite de Detección y Cuantificación .....	49
4.1.5	Exactitud .....	50
4.1.6	Estabilidad.....	50
4.1.7	Incertidumbre .....	53
4.2	Aplicación de la metodología analítica .....	55
<b>5.</b>	<b>Limitaciones del estudio .....</b>	<b>65</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones .....</b>	<b>69</b>
6.1	Conclusiones .....	69
6.2	Recomendaciones .....	70
	<b>Bibliografía .....</b>	<b>71</b>
<b>A.</b>	<b>Anexo: Aprobación de la Comunidad Terapéutica.....</b>	<b>77</b>
<b>B.</b>	<b>Anexo: Consentimiento Informado.....</b>	<b>78</b>
<b>C.</b>	<b>Anexo: Formato de Toma de Muestra .....</b>	<b>79</b>
<b>D.</b>	<b>Anexo: Aprobación del Comité de Ética .....</b>	<b>80</b>

---

<b>E. Anexo: Certificado de Pasantía Internacional .....</b>	<b>81</b>
<b>F. Anexo: Datos para cálculo de parámetros de validación y contenido de cocaína en las muestras .....</b>	<b>83</b>
<b>G. Anexo: Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación y contenido de cocaína en las muestras .....</b>	<b>91</b>

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 2-1:</b> Diagrama del folículo piloso. Modificado de Kintz, 2007 .....	8
<b>Figura 2-2:</b> Fases de crecimiento del cabello. Modificado de Kintz, 2007 .....	9
<b>Figura 2-3:</b> Mecanismos de incorporación de drogas en el cabello. Modificado de Pragst & Balikova, 2006 .....	11
<b>Figura 2-4:</b> Biotransformación de la cocaína. Tomado de Frank Mussoff, 2007 .....	18
<b>Figura 3-1:</b> Proceso de toma de muestra. Fotos: William Quevedo. Diseño del rótulo: Mónica Bejarano .....	37
<b>Figura 3-2:</b> Tratamiento de la muestra de cabello para extraer cocaína. Fotos de 2 a 7 tomadas por Victor Manuel Holguín - Unimedios .....	38
<b>Figura 4-1:</b> Cromatograma blanco de matriz .....	43
<b>Figura 4-2:</b> Cromatograma de la muestra 10 (M10), sin interferentes en el tiempo de retención de la cocaína. 1) TIC de M10. 2-3-4) Iones característicos de la cafeína.....	44
<b>Figura 4-3:</b> Curvas de calibración en A. Sistema y B. Método .....	47
<b>Figura 4-4:</b> Imágenes de cabello bajo el microscopio después de la tinción con azul de metileno .....	55
<b>Figura 4-5:</b> Cromatograma y espectro de masas de cocaína detectada en M24 segmento distal (1. TIC, 2. Ión 82, 3. Ión 182, 4. Ión 303) .....	58
<b>Figura 5-1:</b> Cromatograma benzoilecgonina derivatizada sin identificar, e iones característicos 82, 240 y 361 .....	67

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 2-1:</b> Cutoffs propuestos para diferentes drogas en cabello en análisis de confirmación. Adaptado de Kintz, 2007 .....	29
<b>Tabla 3-1:</b> Condiciones cromatográficas de trabajo .....	39
<b>Tabla 3-2:</b> Tiempos de retención de cocaína y cocaína-D3.....	40
<b>Tabla 4-1:</b> Repetibilidad en sistema y método.....	45
<b>Tabla 4-2:</b> Precisión Intermedia del Sistema y del Método .....	46
<b>Tabla 4-3:</b> ANOVA para Precisión Intermedia .....	46
<b>Tabla 4-4:</b> Datos y resultados de la pruebas de hipótesis para intercepto, pendiente y coeficiente de correlación, de las curvas de calibración para sistema y método.....	48
<b>Tabla 4-5:</b> Análisis de varianza para las curvas de calibración en sistema y método .....	49
<b>Tabla 4-6:</b> Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación.....	49
<b>Tabla 4-7:</b> Estabilidad de la cocaína extraída de cabello a corto plazo a temperatura ambiente .....	50
<b>Tabla 4-8:</b> Estabilidad a largo plazo de la cocaína en matriz fortalecida .....	51
<b>Tabla 4-9:</b> Estabilidad de la solución stock de cocaína .....	52
<b>Tabla 4-10:</b> Estabilidad del estándar interno en solución .....	53
<b>Tabla 4-11:</b> Incertidumbre de la medida.....	54
<b>Tabla 4-12:</b> Contenido de cocaína en las muestras de cabello de los sujetos de estudio.....	57
<b>Tabla 5-1:</b> Procedimientos de derivatización ensayados.....	66

## Lista de cuadros

	Pág.
<b>Cuadro 1:</b> Datos para el cálculo de repetibilidad en sistema y método.....	83
<b>Cuadro 2:</b> Datos para el cálculo de precisión intermedia en sistema y método .....	84
<b>Cuadro 3:</b> Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y método .....	85
<b>Cuadro 4:</b> Datos para las curvas de concentraciones bajas en sistema y método.....	86
<b>Cuadro 5:</b> Datos para las curvas de desviaciones estándar frente a la concentración para el cálculo de los límites de detección y cuantificación .....	87
<b>Cuadro 6:</b> Datos para calcular la incertidumbre debida a las pipetas automáticas y el balón volumétrico.....	87
<b>Cuadro 7:</b> Datos para calcular la incertidumbre debida a las curvas de calibración.....	88
<b>Cuadro 8:</b> Datos para calcular el contenido de cocaína en cada muestra y su incertidumbre .....	89



## Lista de Símbolos y abreviaturas

### Símbolos

Medida	Término	Unidad SI
Longitud	Centímetros	cm
Longitud	Milímetros	mm
Masa	Gramos	g
Masa	Miligramos	mg
Masa	Microgramos	$\mu\text{g}$
Masa	Nanogramos	ng
Temperatura	Grados centígrados	$^{\circ}\text{C}$
Tiempo	Minutos	min
Tiempo	Segundos	s
Relación	Masa / Carga	m/z

### Subíndices

Subíndice	Término
Mx	Muestra número x, donde x=1 a 27
Sa	Desviación estándar intercepto
Sb	Desviación estándar pendiente
t <sub>x</sub>	Tiempo x, donde x=0, 1, 2, 3
Tr	Tiempo de retención
U	Incertidumbre expandida
Uc	Incertidumbre combinada
Ucal	Incertidumbre de la curva de calibración del método
Up1	Incertidumbre de la pipeta uno
Up2	Incertidumbre de la pipeta dos
Us	Incertidumbre del estándar
Uv p1	Incertidumbre del volumen de reconstitución
Uw	Incertidumbre del pesaje de la muestra

## Abreviaturas

Abreviatura	Término
BE	Benzoilecgonina
BSTFA	<i>N,O</i> -bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide
CDER	Center for Drug Evaluation and Research
CE	Cocaetileno
COC	Cocaína
CV	Coeficiente de variación
DE	Desviación Estándar
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMIT	Enzyme-Multiplied Immunoassay
FDA	Food and Drug Administration
FPIA	Fluorescence Polarization Immunoassay
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
LC	Cromatografía Líquida
LCI	Límite de Confianza Inferior
LCS	Límite de Confianza Superior
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
MS	Espectrometría de Masas
MTF	Monitoring the Future
NC	Norcocaína
ND	No detectado
NIDA	National Institute of Drug Abuse
NIST	National Institute of Standards and Technology
NSDUH	National Survey on Drug Use and Health
RIA	Radioimmunoassay
SAMHSA	Substance Abuse and Mental Health Service Administration
SOHT	Society of Hair Testing
TMCS	Trimethylchlorosilane
UV	Ultravioleta
UNODC	United Nations Office on Drugs and Crime

# Introducción

El uso y abuso de sustancias psicoactivas es un problema de salud pública, el cual, año tras año, es valorado mediante estudios que permiten un conocimiento tanto de las drogas consumidas como de los grupos afectados.

El último informe mundial sobre drogas, de la oficina contra la droga y el delito de la Organización de las Naciones Unidas (UNODC) (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012), describe que el consumo global de drogas ilícitas se ha mantenido estable entre los años 2006 y 2010, siendo éste de 3.4 a 6.6% en la población adulta (entre 15 y 64 años de edad); sin embargo, un 10 a 13% de los consumidores presentan problemas por su dependencia a la droga y/o su uso descuidado; drogas como la heroína, la cocaína, entre otras, matan alrededor de 0.2 millones de personas cada año. De acuerdo con el Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en Población Escolar, Colombia - 2011 (Gobierno Nacional de la República de Colombia, 2011), que tuvo en cuenta escolares de sexto a undécimo grado y de edades entre 11 y 18 años, un 12.1% de los estudiantes en Colombia declaran haber consumido al menos una sustancia ilícita alguna vez en la vida, siendo mayor en hombres con respecto a las mujeres.

El uso de drogas estimado para el 2010 a nivel mundial (United Nations Office on Drugs and Crime, 2012), se reporta como sigue: la mayor cantidad de personas consumen cannabis (2.6-5.0%), seguido por estimulantes tipo anfetaminas (excluyendo éxtasis) 0.3-1.2%, luego éxtasis 0.2-0.6%, opiáceos 0.3-0.5% y cocaína 0.3-0.4%. De ahí que estas drogas generen gran interés.

En el caso de la cocaína, en Estados Unidos, el Estudio de Observación del Futuro (MTF) (Johnston, O'Malley, Bachman, & Schulenberg, 2011), un estudio nacional de estudiantes de 8°, 10° y 12° grado, muestra que desde 1999 ha habido una disminución

constante en las tasas de prevalencia para el uso actual, anual y en la vida, de cocaína y crack en los tres grados de escolaridad. Asimismo, la Encuesta Nacional sobre el uso de drogas y la salud (NSDUH) (Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2011), reporta que el consumo actual de cocaína ha disminuido gradualmente del 2003 al 2009 entre las personas de 12 años de edad y mayores (de 2.3 a 1.6 millones). En Colombia (Gobierno Nacional de la República de Colombia, 2011) por lo contrario, el uso de cocaína muestra un aumento tanto en la prevalencia de uso alguna vez en la vida (de 1.9% en el 2004 a 3.3% en el 2011), como de último año (de 1.6% en el 2004 a 2.2% en el 2011). Esta información conduce a considerar la necesidad de herramientas que permitan controlar el uso de drogas como la cocaína, para evitar problemas en la salud personal, familiar y social.

En la actualidad, una de las estrategias para monitorear y controlar el consumo de sustancias psicoactivas, es el análisis toxicológico de matrices biológicas, tradicionalmente orina; matriz de fácil obtención y manipulación, pero susceptible a adulteración o falsificación, cuya aplicación se limita a la detección de drogas consumidas recientemente, puesto que éstas se biotransforman para ser eliminadas en forma de metabolitos, que a su vez se conservan por un corto tiempo en dicho fluido. Teniendo en cuenta que este mecanismo no es útil para evaluar un consumo de largo plazo, se considera la utilización de una matriz alternativa como lo es el pelo, que tiempo atrás, se usó para documentar la exposición crónica a una droga, siendo los opiáceos las primeras drogas reportadas en esta matriz (Baumgartner, Jones, Baumgartner, & Black, 1979).

Países como Alemania, Francia, Croacia, España, Canadá, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Chile, entre otros, han venido desarrollando metodologías analíticas utilizando el pelo como matriz, para resolver casos que impliquen una exposición crónica a sustancias psicoactivas, de una persona o grupos de personas determinados. Por ejemplo, la exposición de niños a drogas en casa o durante el embarazo, la evaluación del consumo de drogas de abuso en colegios y universidades, el control de dopaje en diferentes deportes, el seguimiento de personas en programas de rehabilitación para drogodependientes, la investigación de delitos bajo efectos de una droga, la confirmación

de una sospecha de consumo de drogas ilícitas por parte de reclusos y, la verificación de un posible consumo en el lugar de trabajo; sin embargo, están limitadas a nivel nacional.

Aunque desde hace algunos años se están realizando esfuerzos en Colombia, no se han implementado aún, análisis toxicológicos de rutina en pelo, debido a su complejidad, al mayor costo en comparación con el tradicional análisis de drogas en orina y principalmente, al desconocimiento de que dicha matriz es una fuente de información valiosa, que presenta muchas ventajas frente a otras matrices; permite conocer el historial de consumo de sustancias psicoactivas de un individuo, la toma de muestra no es invasiva, es de fácil consecución, no es susceptible a adulteración, es muy estable, aunque parece frágil, no se destruye a menos que se incinere o se someta a ácidos fuertes que la dañen.

A través del tiempo, la búsqueda de drogas en cabello, se ha realizado mediante diferentes técnicas, con tendencia a mejorar la calidad de los resultados. Entre las de tamizaje se encuentran las técnicas inmunoquímicas tales como el radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo por detección de fluorescencia polarizada (FPIA), inmunoensayo enzimático (ELISA), inmunoensayo enzimático multiplicado (EMIT) y, entre las de confirmación están la cromatografía líquida acoplada a un detector de masas (HPLC-MS) o detector ultravioleta (HPLC-UV) y, la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS). Se seleccionó esta última que constituye una técnica sensible y específica para el análisis de drogas, puesto que además, el material biológico se caracteriza por ser una matriz de composición compleja, contener analitos a muy baja concentración (ng/mg y hasta pg/mg de cabello), alta posibilidad de interferencias y acceso limitado a material de referencia. Estas dificultades pueden superarse seleccionando un adecuado procedimiento para tratar la muestra (Janicka, Kot-Wasik, & Namiesnik, 2010).

La investigación se desarrolló en el marco de la toxicología analítica y la toxicología de la farmacodependencia, áreas en las que se presentan limitaciones y variables que no se pueden controlar, es una de las razones por las cuales hasta el momento la literatura no es concluyente acerca de una relación dosis – respuesta, es decir, la cinética de eliminación de las drogas a través del cabello especialmente de la cocaína, no es totalmente clara porque se ve influenciada por factores como la pigmentación y el

cuidado referente al uso de productos cosméticos que pueden llegar a ser muy agresivos; por otro lado, la tasa de crecimiento del cabello varía en cada individuo dependiendo de la edad, la raza y el género, lo que conlleva a una cuidadosa interpretación de los resultados.

De acuerdo con los puntos de corte establecidos internacionalmente para el análisis de cocaína y sus metabolitos en cabello, se consideran positivos, los resultados iguales o mayores a 0.5 y 0.05 ng/mg, respectivamente (Kintz, 2007), es decir, los niveles de detección de los metabolitos son diez veces más bajos que la molécula intacta de cocaína. Por otro lado, los estudios reportan un amplio rango de hallazgos analíticos, por ejemplo, de 0.31 a 89 ng/mg de cocaína obtenidos de 70 muestras allegadas al Instituto Nacional de Toxicología, Sevilla España (Jurado, Giménez, Menéndez, & Repetto, 1995), así que, en los participantes de esta investigación, se esperaría encontrar concentraciones de cocaína variadas.

El desarrollo experimental inició con la definición de los parámetros del sistema cromatográfico, el muestreo y, la elección y adecuación de un proceso para el tratamiento de muestras, que incluyó lavado, digestión y extracción de analitos; continuó con la validación total de la metodología, utilizando la Guía para la Validación de Métodos Bioanalíticos del CDER; y finalizó con el análisis de muestras de cabello por segmentos para lograr una aproximación al historial de consumo de cocaína, de una población de niñas entre los 12 y 18 años pertenecientes a un centro de rehabilitación para farmacodependientes.

En este contexto, la presente tesis es el primer paso que se da en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, en la investigación de sustancias psicoactivas en pelo.

# 1. Planteamiento del Problema

Existen diversos mecanismos para la evaluación del uso de sustancias psicoactivas. Son conocidos los estudios de prevalencia, mediante los cuales se estima el consumo de drogas ilícitas en un período de tiempo y en determinadas poblaciones, recopilando los datos mediante encuestas. Este tipo de instrumentos para obtener información, pueden verse limitadas a la escasa y/o errónea información obtenida de los participantes. De allí la utilidad de incorporar herramientas complementarias que permitan cuantificar y confirmar dicha información, para realizar un análisis comparativo y aproximarlos con mayor certeza a la realidad.

A nivel mundial, se usa el análisis toxicológico de muestras biológicas como estrategia para cuantificar el consumo de sustancias psicoactivas. Del objeto de dicho análisis con relación a la ventana de detección, dependerá la elección de la matriz más adecuada. La evaluación del consumo reciente útil en múltiples situaciones, generalmente se realiza en matrices convencionales como la orina, pero en el caso de una exposición crónica, debe acudirse a una alternativa como lo es el cabello. Sin embargo, a nivel nacional, una sola entidad posee una metodología validada para llevar a cabo este último tipo de análisis y es: el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses (Riveros Toledo & Martínez Ramírez, 2008) en la ciudad de Bogotá, por tanto, en el país este servicio aún no está disponible para la población en general.

En este contexto, Colombia tiene la necesidad, no solo de la implementación de una metodología analítica que permita identificar y cuantificar drogas tales como la cocaína en una matriz adecuada para evaluar el consumo crónico como el cabello, sino que además, dicho método cumpla con los parámetros requeridos para que los resultados sean válidos.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo General**

Implementar una metodología analítica para la identificación y cuantificación de cocaína en cabello mediante GC-MS, en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, como método confirmatorio de un posible consumo crónico.

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

1. Optimizar y validar una metodología analítica para la identificación y cuantificación de cocaína en cabello, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
2. Probar la metodología analítica validada en un grupo de individuos consumidores, mediante el estudio de segmentos de cabello, y conocer el posible historial de uso de cocaína.



## **2. Marco Conceptual**

### **2.1 La matriz: Pelo**

#### **2.1.1 Estructura y crecimiento del cabello**

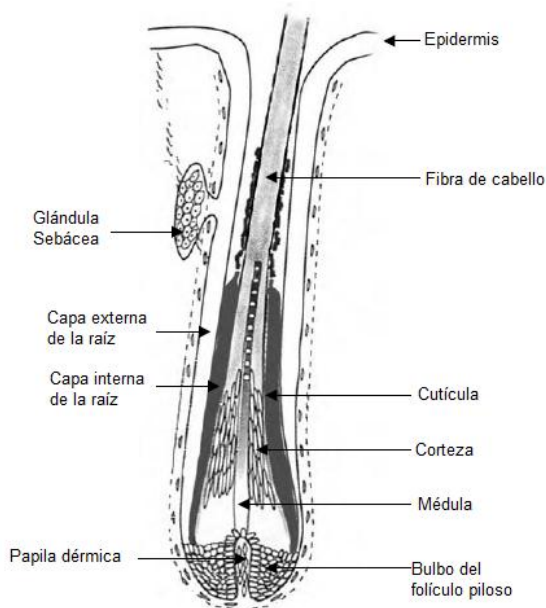
El pelo es un anexo de la piel, sintetizado en el folículo piloso. Está compuesto por un 65 a 95% de proteínas (principalmente keratinas), 1 a 9% de lípidos, 0.1 a 5% de pigmentos (melanina), 0.25% a 0.95% de sales minerales y pequeñas cantidades de elementos traza, polisacáridos y 15 a 45% de agua. Constituido por una serie de células superpuestas que forman la cutícula y células corticales que forman la corteza, en cuyo centro, las células condensadas forman la médula, como se muestra en la Figura 2-1. La cutícula tiene la función de proteger de la agresión del ambiente a las células de la corteza, ya sea de la radiación ultravioleta, agentes químicos y estrés mecánico; a medida que el pelo envejece, hay una degradación gradual de las células de la cutícula a lo largo de todo el pelo y por ende, de su función protectora, además, puede ser total o parcialmente perdida en casos de enfermedades del pelo; estos factores pueden influir en la fijación y estabilidad de drogas en el pelo. El pH de la matriz pilosa es ácido (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

En el bulbo del folículo, altamente vascularizado, las células experimentan mitosis extendiéndose hacia arriba para formar el cuerpo del cabello, las cuales reciben la melanina proveniente de la papila dérmica; además, tienen la capacidad de cambiar morfológica y estructuralmente durante el crecimiento, formando distintas calidades de pelo, difiriendo en calidad y cantidad de proteínas y pigmentos (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

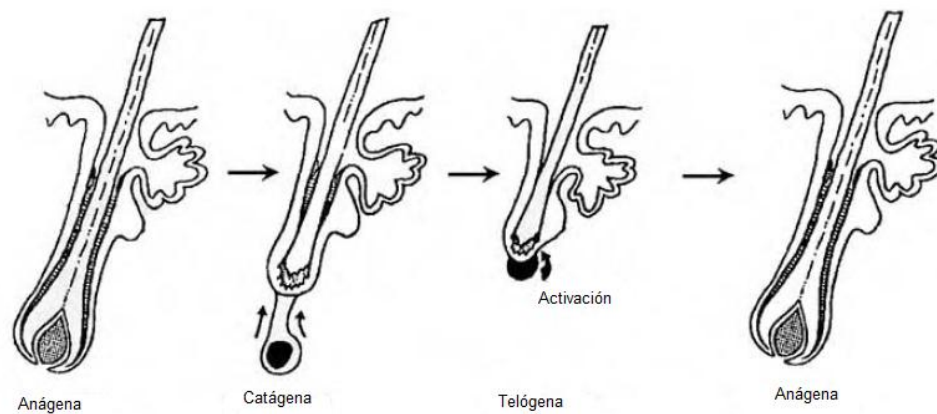
La estructura básica del pelo consiste en dos o tres cadenas de keratina entrecruzadas en hebras llamadas microfibrillas. Las hebras de pelo son estabilizadas y adquieren su

forma por uniones disulfuro e hidrógeno que hacen que el pelo adquiera una estructura semicristalina (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

**Figura 2-1:** Diagrama del folículo piloso. Modificado de Kintz, 2007



En general, la tasa de crecimiento del cabello es de 1 cm/mes (Society of Hair Testing, 2004) o, 0.35 mm por día tanto en hombres como en mujeres, pero puede variar ampliamente, entre 0.07 a 0.78 mm por día (Kintz, 2007); también varía entre pelos del cuero cabelludo con respecto al pelo de otras regiones del cuerpo, (axilar, torácico, púbico) (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3). El cabello crece siguiendo un ciclo de tres fases ilustradas en la Figura 2-2; inicia con la anagénica en la que se forma el folículo y se produce el cabello, cuya duración es variable de 7 a 94 semanas (85-90% del pelo), continúa con la catagénica de pocas semanas, en la que cesa la actividad del bulbo folicular y, termina con la telogénica de 4 a 6 meses (10-15% del pelo) (Kintz, 2007). El hecho de que el pelo se encuentre en distintas fases de crecimiento y la tasa de crecimiento varíe, es importante para determinar de qué región tomar la muestra para ser analizada. La región óptima de muestra de cabello es la posterior de la cabeza dado que en ella alrededor de un 85% de los folículos se encuentran en fase anagénica y es además el tipo de pelo que presenta mayor tasa de crecimiento, llegando a ser el crecimiento del pelo de la región del vértice en mujeres superior a 1.12 mm por día (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

**Figura 2-2:** Fases de crecimiento del cabello. Modificado de Kintz, 2007

En el nacimiento, las células están en activa proliferación mientras que en su extensión el metabolismo residual es prácticamente insignificante. En el folículo del pelo han sido identificadas enzimas de la familia Citocromo P 450 así como otras enzimas que proveen evidencia de que puede ocurrir metabolismo de drogas dentro de la estructura pilosa, sin embargo, como la keratinización del pelo se produce en dos o tres días, ésta capacidad metabólica se encontraría muy restringida (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

### 2.1.2 Pigmentación

La melanina es sintetizada por los melanocitos que a su vez se encuentran en los melanosomas. La melanogénesis inicia con la unidad estructural básica que consta de tirosina y proteína, seguida de la formación de una estructura membranosa interna donde se sintetiza y acumula la melanina que el melanosoma transforma en partículas uniformes, asimismo, se transportan principalmente a la corteza, en menor proporción a la médula y rara vez a la cutícula, para finalmente formar el cabello pigmentado durante la fase anagénica. El color del cabello depende de la información genética de cada individuo; su diversidad se debe a cuatro tipos de melanina: eumelanina (negro a café oscuro), oxieumelanina (café a castaño) feomelanina (rojo luminoso) y oxifeomelanina (otros matices de rojo) (Kintz, 2007).

La melanina juega un rol importante en la incorporación de drogas básicas en el pelo. En estudios con animales se demostró que hubo una buena correlación entre la afinidad a la

melanina y la incorporación de la droga en el pelo. En un estudio con cabello humano se encontró que la concentración de drogas fijadas en pelo pigmentado es mucho mayor que en pelo claro (Perkins de Piacentino, Locani, & Lorenzo, Año 3).

### **2.1.3 Mecanismos de incorporación de drogas en el cabello**

Los mecanismos exactos involucrados en la incorporación de drogas en el cabello siguen siendo investigados. El mecanismo típico asume que las drogas ingresan en el pelo mediante difusión pasiva. El bulbo del folículo piloso, que reúne un complejo de proteínas y proteínas lipídicas dando origen a membranas celulares, es la parte más vulnerable al ataque químico y mecánico y, es el punto de difusión primario para la incorporación y eliminación de drogas; aquí se depositan preferiblemente las drogas lipofílicas. Asimismo, cada hebra de cabello está ligada a una glándula sebácea que garantiza cubrir de sebo el pelo maduro por encima de la raíz, de dos a tres días antes de alcanzar la superficie de la piel. Por otro lado, las glándulas sudoríparas están separadas de la raíz del cabello, se encargan de humedecerlo y contribuyen con la incorporación de drogas hidrofílicas (Pragst & Balikova, 2006).

La Figura 2-3 muestra las vías por las cuales se propone que las drogas se incorporan en el cabello.

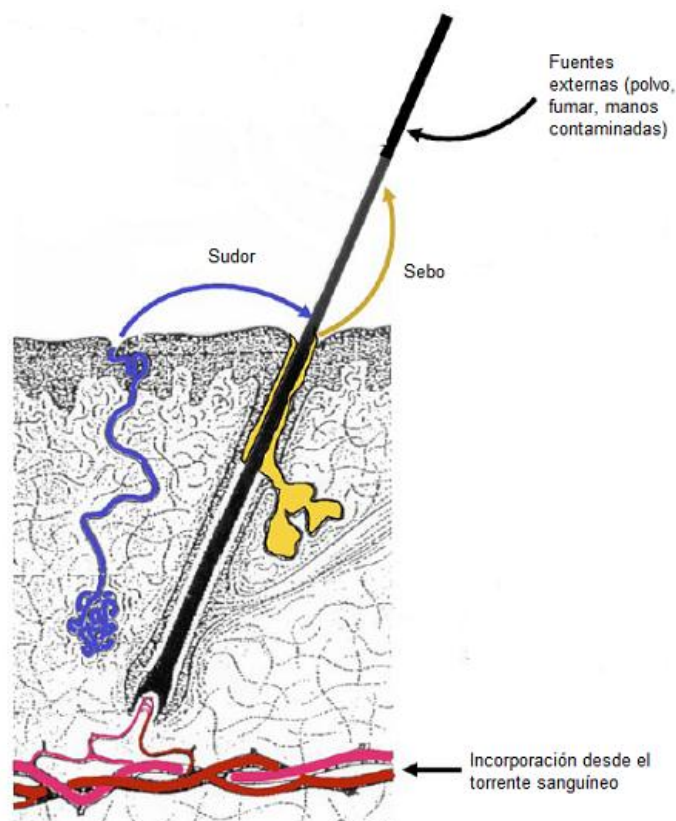
- Difusión pasiva o activa desde el torrente sanguíneo

Dado que las células del folículo experimentan una alta división celular, están muy bien irrigadas, por tanto, las drogas pueden difundir a través de sus membranas cumpliendo con ciertas características. La naturaleza de la sustancia incorporada (estructura y propiedades químicas), así como también, las características físicas y fisiológicas del individuo, ejercen una fuerte influencia sobre el mecanismo de incorporación que predominará.

Desde el punto de vista estructural, afectará el contenido de melanina del cabello y la liposolubilidad y basicidad de la droga. En el caso del cabello canoso, el cual es una mezcla de pelo blanco y pigmentado, la concentración de drogas básicas es 10 veces mayor en cabello pigmentado, aunque no hay diferencias en el contenido de sustancias neutras. Esta afinidad por la melanina puede atribuirse a una fuerte interacción iónica

entre las drogas cargadas positivamente y el polímero de melanina poli-aniónico, ausente en el pelo blanco (Kintz, 2007).

**Figura 2-3:** Mecanismos de incorporación de drogas en el cabello. Modificado de Pragst & Balikova, 2006



De acuerdo con los principios farmacológicos de distribución de drogas, las moléculas orgánicas lipofílicas (sin carga) pueden penetrar fácilmente membranas y difundir de acuerdo con el gradiente de concentración de la matriz celular (Pragst & Balikova, 2006). Generalmente las drogas son ácidos o bases débiles, por lo que se ven influenciadas por el gradiente de pH, mientras que el de la sangre es de 7.3, el de los keratinocitos y melanocitos está entre 3 y 6, de esta manera, las drogas básicas pueden difundir en dichas células y una vez dentro, se protonarán quedando no disponibles para retornar al torrente sanguíneo (Kintz, 2007). Estos dos efectos, pH bajo y unión a melanina, llevan a una mayor acumulación de sustancias lipofílicas y básicas en la matriz celular, con una clara preferencia por el cabello pigmentado (Pragst & Balikova, 2006).

La eficiencia de la incorporación de la droga en el folículo piloso se mide teniendo en cuenta la tasa de incorporación; de las drogas más comúnmente usadas, la cocaína es la que presenta mayor eficiencia, siendo la liposolubilidad y la basicidad, las características principales que favorecen dicha incorporación. En este sentido, teniendo en cuenta que el metabolismo conlleva a un incremento en la hidrosolubilidad de las moléculas, los metabolitos, como la benzoilecgonina, entran en el cabello en menor cantidad que su precursor lipofílico (Pragst & Balikova, 2006).

- Incorporación desde el sudor y otras secreciones

Las drogas y sus metabolitos se excretan a través del sudor; en el caso de la cocaína es excretada en este fluido en un rango de tiempo altamente variable, de 2 a 48 horas. También pueden eliminarse a través del sebo que es un material lipídico excretado por las glándulas sebáceas, las cuales se hallan asociadas principalmente a los folículos pilosos, aunque algunas glándulas tienen ductos que les hace secretar sebo directamente a la superficie de la piel. La concentración con que contribuye el sebo al depósito de drogas en el pelo se desconoce aún. Si la droga está presente en el sebo puede depositarse en el pelo a través de un íntimo contacto de éste con la piel del cuero cabelludo (Kintz, 2007).

La mayor contribución de drogas en el pelo proviene del sudor y de la excreción sebácea que impregna el pelo, tanto durante su formación como en su maduración. Los analitos predominantes generalmente encontrados en pelo son las drogas intactas, es decir, sin metabolizar, mientras que los metabolitos por ser más polares, predominan preferiblemente en orina (Kintz, 2007).

- Incorporación desde la contaminación externa

Estudios publicados describen que las drogas como la cocaína y la marihuana se incorporan en el cabello cuando se está en un ambiente contaminado por las mismas (Kintz, 2007), por tanto, se han ido afinando las técnicas de lavado que se emplean para remover la droga que se encuentra externamente en el pelo para que sean altamente eficientes y facilitar la distinción de una administración voluntaria de la droga de una involuntaria (administración pasiva) ante un resultado analítico positivo.

### **2.1.4 Estabilidad de las drogas en el cabello**

La incorporación de las drogas en el cabello es muy estable. Los compuestos orgánicos son capaces de sobrevivir en el cabello por miles de años bajo condiciones favorables (temperatura ambiental y atmósfera seca) (Kintz, 2004). Los tratamientos cosméticos disminuyen dramáticamente (1-90%) las concentraciones originales porque dañan el cabello o alteran directamente la estabilidad de la droga en el mismo (Pragst & Balikova, 2006).

A pesar de ello, la retención y estabilidad de las drogas en el cabello se considera buena; se ha demostrado en segmentos de cabello de sujetos que reciben dosis constantes. Las medidas determinadas en 2-5 segmentos de 3 cm de largo, para 23 drogas y metabolitos diferentes, en 82 muestras de cabello, muestran que las concentraciones disminuyen lentamente con el incremento de la distancia de la raíz del cabello; en la porción que representa más de un año (>12-15 cm), aún se detecta alrededor de un 4% de la droga. La duración de una droga en el cabello depende de su estructura química e incrementa con la polaridad, es decir, los metabolitos (comúnmente más polares que sus precursores) se eliminarán más lentamente, por tanto, la relación metabolito/droga incrementa de proximal a distal (Pragst & Balikova, 2006). Sin embargo debe considerarse la posibilidad de la formación de metabolitos en el cabello por hidrólisis, como en el caso de la cocaína que fácilmente sufre degradación hidrolítica a benzoilecgonina.

### **2.1.5 Aplicaciones del análisis de drogas en cabello**

- Exposición de niños a drogas en casa y/o durante el embarazo

El análisis de cabello para detectar drogas en niños comúnmente se realiza en casos de custodia, cuando uno de los padres acusa al otro de consumir drogas y exponer a su hijo de forma pasiva (en caso de que fume) o activa (si le administra la droga al niño).

Un estudio realizado en Estados Unidos (Delaney-Black, y otros, 2011), evaluó la relación entre la exposición prenatal y postnatal a cocaína y, el uso de cocaína en adolescentes, concluyendo que la exposición durante el embarazo y el uso de cocaína por padres o cuidadores después del nacimiento se relaciona únicamente con el uso de

cocaína en adolescentes particularmente a los 14 años de edad. Además, evidencia la importancia tanto de la exposición prenatal como del uso de la droga por madres o cuidadores de los bebés al nacer, en la transmisión trans-generacional del uso y abuso de sustancias.

Por ejemplo, el caso en que un bebé caucásico de un mes de vida, llega a un servicio de urgencias con dificultad respiratoria y anormalidades neurológicas (Joya, y otros, 2011); una prueba rápida en orina solo resulta positiva para opiáceos, de lo cual se deduce una exposición aguda a éstos, pero el análisis toxicológico de muestras de cabello tanto del bebé como de sus padres, revela además, la presencia de metabolitos de la cocaína y, más aún, el análisis de la muestra de cabello por segmentos de la madre, sugiere la exposición del niño durante el embarazo y después de nacer, dada su corta edad.

- Seguimiento de programas de rehabilitación para drogadictos

El análisis de drogas de abuso en cabello, de acuerdo con el segmento analizado, permite conocer si el consumidor que se sometió a un tratamiento de su adicción, recayó en algún momento del proceso, como lo cuenta la experiencia canadiense (Klein, Karaskov, & Koren, 2000).

- Control de doping

Durante años el pelo se ha utilizado en toxicología para documentar la exposición a drogas, en casos clínicos, ocupacionales y forenses, pero aún no es reconocido por el Comité Olímpico Internacional, como tecnología en el control al dopaje (Kintz, 1998). En este caso es útil el análisis de sustancias prohibidas en el deporte, en el cabello del deportista, para conocer si es consumidor regular de alguna de ellas, puesto que un tamizaje de rutina en orina solo da información de un consumo reciente.

- Comisión de delitos bajo efectos de una droga o apoyados en el uso de ellas

Esta es una aplicación muy importante para el ámbito judicial, pues los hallazgos pueden determinar si una persona había consumido alguna droga en el mismo tiempo en que cometió uno o varios delitos, lo cual es un agravante en su sentencia.



En investigación forense, el cabello es una herramienta muy útil, por ejemplo, en el esclarecimiento de la comisión de delitos apoyados en el uso de sustancias tóxicas como fármacos y drogas de abuso para que las víctimas pierdan la voluntad y la memoria (Scott K. , 2009). Dependiendo del tiempo transcurrido a partir del hecho hasta su conocimiento, debe tomarse la mejor decisión acerca de qué muestra es la más adecuada para la búsqueda de sustancias involucradas.

- Confirmación de una sospecha de consumo de drogas ilícitas por parte de reclusos

Dentro de las cárceles o que estén en libertad condicional, puesto que el cabello es una matriz que no pueden alterar como comúnmente lo hacen con la orina.

- Verificación de un posible consumo en el lugar de trabajo

Aplica principalmente para empresas de transporte, aviación.

- Evaluación de consumo de drogas ilícitas en jóvenes estudiantes

Dado que hay un subregistro en el consumo de drogas, el análisis de éstas en cabello es una herramienta útil para conocer la prevalencia de consumo en diferentes poblaciones, por ejemplo en estudiantes sea de colegio o universidad, como lo muestra un estudio realizado en Santiago de Compostela (Quintela, Bermejo, Tabernero, Strano-Rossi, Chiarotti, & Lucas, 2000), el cual arrojó resultados positivos para consumo de cocaína en el 19% de 200 muestras analizadas.

- Suspensión de licencias de conducción

En países como Suecia (Kronstrand, Nyström, Forsman, & Käll, 2010) o Italia (Ricossa, Bernini, & De Ferrari, 2000), cuando una persona conduce bajo la influencia de drogas, su licencia puede ser suspendida. Este control se lleva a cabo mediante muestras de orina, sin embargo, dada la corta vida media de las drogas y sus metabolitos en esta matriz (excepto la marihuana) y la incomodidad de la toma de muestra, consideran el cabello una mejor opción para realizar dicho control.

- Comparación de resultados cuantitativos con los cualitativos obtenidos en los estudios poblacionales de consumo de drogas

El análisis de drogas en pelo contribuye con la evaluación del consumo de ellas durante largos períodos de tiempo, permitiendo de esta manera, corroborar el testimonio de los participantes de los estudios poblacionales en el tema. Así, se podrá fortalecer la investigación realizada mediante encuestas y comprobar si los datos se acercan a la realidad, ya que los participantes pueden errar al brindar la información solicitada.

Un estudio que compara análisis en cabello con lo que cada participante reporta acerca de su consumo de cocaína (Vignali, Stramesi, Vecchio, & Groppi, 2012), muestra que sus resultados cuantitativos concuerdan bien con lo que dicen haber consumido, sin embargo la correlación entre la frecuencia de consumo y las concentraciones encontradas en cabello, reveló concentraciones mucho mayores a las esperadas según lo que los participantes manifestaron; además, no hubo una clara diferencia entre los consumidores ocasionales y los que consumen a diario; de los 113 participantes en el estudio, en 23 encontraron discrepancias entre los análisis toxicológicos y la declaración de consumo de cada sujeto; de 98 muestras positivas para cocaína, 90 habían revelado que efectivamente eran consumidores de cocaína.

Otro estudio que compara los ensayos analíticos en cabello con el testimonio de unos consumidores de heroína acerca de su posible consumo de cocaína (Tassiopoulos, Bernstein, Heeren, Levenson, Hingson, & Bernstein, 2004), mostró que de los 336 sujetos que resultaron positivos en el consumo de cocaína, el 34.2% no reportaron haberlo hecho.

## **2.2 El analito: Cocaína**

La cocaína es una droga estimulante del sistema nervioso central y altamente adictiva. En forma de sal (clorhidrato) se puede inhalar o disolver en agua para inyectarse. No importa la forma ni la frecuencia de consumo, el consumidor de cocaína se expone a tener una emergencia cardiovascular o cerebrovascular aguda, que puede resultar en la muerte súbita. Actúa interfiriendo con el proceso de reabsorción de la dopamina, cuya acumulación resulta en una estimulación continua de las neuronas “receptoras”, lo cual

está asociado con la euforia comúnmente reportada por las personas que abusan de la cocaína (National Institute of Drug Abuse, NIDA, septiembre de 2009).

### 2.2.1 Toxicocinética

La cocaína es una base débil con un pKa de 8.6. En su forma básica, tanto en sangre como en el humo del tabaco que llega a los pulmones, atraviesa las membranas celulares de forma rápida y eficiente. Atraviesa la barrera hematoencefálica llegando al cerebro en 30 segundos cuando se esnifa o se administra vía intravenosa, mientras que, si se fuma, tarde solamente 5 segundos en tener efectos centrales.

El tiempo en que se alcanza la máxima concentración de cocaína en sangre depende de la vía de administración, así, vía intravenosa se conseguirá en 3-5 min, vía oral 60-90 min, inhalada o fumada (pasta de cocaína) 15-60 min (MICROMEDEX 2.0, 2012).

- Absorción

La cocaína se absorbe vía oral (a nivel intestinal) con una biodisponibilidad del 30-40%, el resto sufre un metabolismo de primer paso. La absorción intranasal puede estar limitada por la potente vasoconstricción de la droga, disminuyendo así, su biodisponibilidad.

- Distribución

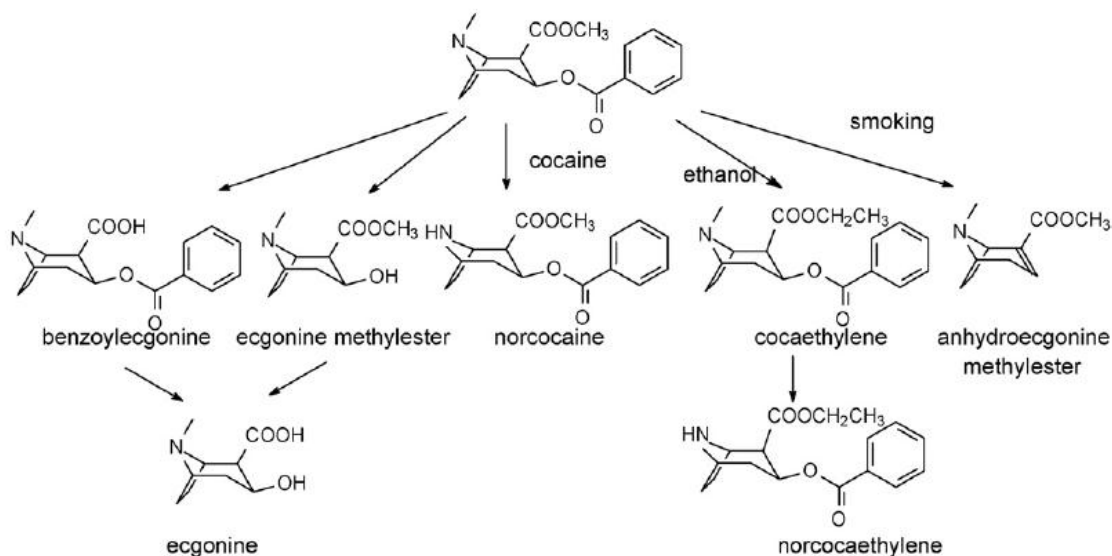
La cocaína ingresa en el sistema nervioso central, pero es metabolizada rápidamente, aunque sus metabolitos no atraviesan la barrera hematoencefálica tan efectivamente como su precursor. Esta droga atraviesa también la placenta.

- Metabolismo

La cocaína es rápidamente metabolizada, generalmente por hidrólisis enzimática (pseudocolinesterasas plasmáticas y enzimas hepáticas). A nivel hepático además, sucede una N-desmetilación; el hígado puede detoxificar una dosis letal mínima por hora, más de 10 gramos por día. El aclaramiento metabólico puede verse reducido durante el embarazo. El mayor metabolito es la benzoilecgonina, el cual no presenta actividad, al igual que ecgonina, norbenzoilecgonina, norecgonina, ecgonidina, norecgonidina

metiléster, norecgonina metiléster y M-hidroxibenzoilecgonina, mientras que, el cocaetilo (metabolito obtenido por transesterificación con etanol) presenta actividad farmacológica similar a la cocaína. La **Figura 2-4** muestra los principales metabolitos de la cocaína.

**Figura 2-4:** Biotransformación de la cocaína. Tomado de Frank Mussoff, 2007



Cuando la cocaína se fuma, se piroliza a una serie de compuestos químicos dependiendo de la temperatura; el principal es la anhidroecgonina metil éster, el cual es farmacológicamente activo en animales, sin embargo, se desconoce sus efectos en el ser humano.

#### ▪ Eliminación

La cocaína se elimina a través de la orina de forma inalterada, dependiendo del pH de este fluido (mayor eliminación a bajo pH), en un 1-5%; aproximadamente 75-90% de la dosis administrada, es eliminada como ecgonina metiléster y benzoilecgonina combinadas. Esta droga sigue una cinética de eliminación de primer orden, con una vida media de 75 min después de administración intranasal, 48 min después de consumo oral y 54 min después de exposición intravenosa. Su principal metabolito, benzoilecgonina, tiene una vida media de 5.5 horas.

La benzoilecgonina es un metabolito que se detecta en orina después de 3-4 días del último consumo de cocaína y, depende tanto de la cantidad consumida y vía de administración, como del punto de corte de la prueba.

### 2.2.2 Toxicodinamia

Uno de los sistemas neuronales más afectado por la cocaína se origina en una región del cerebro llamada área ventral del tegmento (AVT), cuyas fibras nerviosas se extienden al núcleo accumbens, una de las áreas involucradas en la gratificación, donde se ve aumentada la actividad neuronal debida al incremento en los niveles de dopamina. La cocaína actúa bloqueando la recaptación de la dopamina en la sinapsis, lo que resulta en una acumulación de la misma y una amplificación de la señal a las neuronas receptoras, provocando la euforia inicial que reportan los cocainómanos (National Institute of Drug Abuse, marzo de 2010).

La cocaína está asociada con ambos efectos sobre el sistema nervioso central: excitación y depresión. Inicialmente, estimula la corteza cerebral que se traduce en excitación, nerviosismo o inquietud; al aumentar la dosis, se estimulan los centros motores, provocando temblores y movimientos convulsivos. Efectos en el tallo cerebral conllevan a taquipnea, taquicardia y vómitos. Con dosis más altas, la depresión del sistema nervioso central progresa y puede resultar en insuficiencia respiratoria y muerte (MICROMEDEX 2.0, 2012).

La cocaína induce vasoconstricción coronaria y trombosis. Esta droga es pirogénica, incrementa la producción de calor vía estimulación de la actividad muscular y reduce la pérdida de calor mediante la vasoconstricción. Clasificada por la FDA en la categoría C de riesgo en embarazo. La ingestión de cocaína durante el embarazo está asociada con parto prematuro, aborto espontáneo, varias anormalidades congénitas; además, puede haber intoxicación neonatal durante la lactancia (MICROMEDEX 2.0, 2012).

Los efectos inmediatos de la cocaína a dosis bajas incluyen euforia, mayor energía, estado de alerta con relación a las sensaciones visuales, auditivas y del tacto, disminución del apetito y de la necesidad de dormir. También hay contracción de los vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas y aumento en la temperatura corporal, la

frecuencia cardíaca y la tensión arterial. Dosis más altas conllevan una mayor euforia, un comportamiento más extravagante, errático y violento; algunos experimentan desasosiego, irritabilidad y ansiedad; también temblores, vértigos, espasmos musculares o paranoia (National Institute of Drug Abuse, marzo de 2010).

La cocaína es una droga altamente adictiva. El consumo constante lleva a que el cerebro se adapte y desarrolle tolerancia, necesitando cada vez una dosis mayor para conseguir el mismo efecto. Puede aumentar la sensibilidad en los consumidores, con respecto a la ansiedad y las convulsiones. El estado de irritabilidad, inquietud y paranoia, puede progresar a un episodio total de psicosis paranoica, perdiendo el sentido de la realidad y experimentando alucinaciones auditivas. Dependiendo de la vía de administración, el daño ocasionado por consumo repetido de cocaína puede variar; la inhalación provoca irritación crónica del tabique nasal, hemorragias nasales, ronquera y pérdida del sentido del olfato, la ingestión puede causar gangrena grave en los intestinos porque reduce el flujo sanguíneo y, la inyección de la droga, además de dejar marcas generalmente en los antebrazos, pueden generar reacciones alérgicas, ya sea a la droga a algunos aditivos, que en casos más severos pueden llevar a la muerte (National Institute of Drug Abuse, marzo de 2010).

### **2.2.3 Cinética de eliminación de la Cocaína a través del cabello**

Asumiendo una tasa de crecimiento del cabello de 1 cm/mes, la vida media de eliminación calculada para la cocaína y su metabolito benzoilecgonina a través de esta matriz es de 1.5 meses tanto en hombres como en mujeres (Garcia-Bournissen, Moller, Nesterenko, Karaskov, & Koren, 2009). Ésta puede verse influenciada por aspectos como la pigmentación, cualidad que da variabilidad interindividual y, los tratamientos cosméticos que pueden llevar a una sobreestimación de la eliminación. Esta afirmación sugiere que puede tomar de 3-4 meses para que el segmento proximal del cabello esté libre de droga.

El reporte de un caso donde se analiza el cabello por segmentos, de una mujer que consumía diariamente cocaína durante un año y decide dejar de consumir (Felli, Martello, Marsili, & Chiarotti, 2005), concluye que la mayor parte de eliminación de la droga se da

en los tres primeros meses después de la abstinencia, puesto que la incorporación desde el flujo sanguíneo ha parado.

### 2.2.4 Uso de múltiples sustancias e interacciones

Una combinación común es cocaína más alcohol, la cual produce una prolongación del efecto estimulante de la cocaína, debido al proceso de transesterificación en el organismo, produciendo cocaetileno, cuya vida media es más larga que la de la misma cocaína. Alcoholemias mayores a 100 mg% pueden prolongar también el tiempo de vida media de la cocaína, puesto que el hígado se satura y, por consiguiente los efectos serán más duraderos (Harris, Everhart, Mendelson, & Jones, 2003).

Se conoce como *speedball* en inglés, a la combinación de cocaína más heroína, en español también se conoce como *revuelto*, *rebujo*, *francés* o *café con leche*. Esta última se usa para disminuir los efectos de la cocaína (National Institute of Drug Abuse, NIDA, septiembre de 2009).

La marihuana incrementa los efectos farmacológicos y toxicológicos de la cocaína, disminuye los efectos disfóricos y aumenta la frecuencia cardíaca. El posible mecanismo involucrado es la vasodilatación inducida por la marihuana de la mucosa nasal, lo cual incrementa la absorción de la cocaína (MICROMEDEX 2.0, 2012).

El uso de tabaco o cafeína junto con un estimulante como la cocaína, pueden contribuir en problemas adicionales, tales como la hipertensión, la hipertermia y la taquicardia, causando efectos adversos graves.

## 2.3 La técnica analítica: GC-MS

La técnica “gold standard” de confirmación para llevar a cabo un análisis cuantitativo adecuado de drogas presentes en muestras de cabello es la espectrometría de masas, la cual puede estar acoplada a Cromatografía de Gases (GC-MS) o más recientemente, a Cromatografía Líquida (LC-MS). Otra posibilidad involucra las técnicas tándem usando MS/MS o bien, MS/MS/MS (Kintz, 2007).

### 2.3.1 Cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es aplicable a un amplio número de compuestos de interés toxicológico en la industria química y farmacéutica, ambiental y clínica. La GC por adsorción fue desarrollada por el científico Fritz Prior en 1940; a inicios de 1950, Archer J. P. Martin y Richard L. M. Synge inventaron la cromatografía por partición por lo que recibieron el Nobel en Química en 1952 (Scott R. , 2003).

La utilización de esta técnica analítica se restringe a la separación de compuestos de peso molecular menor de 1000 uma (unidades de masa atómica) y a una temperatura máxima de trabajo de 400 °C, por tanto, juega un papel importante la estabilidad térmica de la muestra (Scott R. , 2003).

Un sistema cromatográfico consta de una fuente de gas inerte que transporta la muestra más no interactúa con ella, un inyector a temperatura elevada, a través del cual la muestra es introducida dentro de la columna capilar, que a su vez está inmersa en un horno para controlar su temperatura, donde se separarán los componentes de la mezcla y, finalmente un detector que generará una respuesta, que además se mantiene a mayor temperatura que la columna para minimizar el riesgo de fraccionamiento o condensación de los componentes de la muestra (Flanagan, Taylor, Watson, & Whelpton, 2007).

La separación se lleva a cabo por distribución repetida de cada componente de la muestra entre dos fases: en GC la fase móvil siempre es un gas (comúnmente N<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, He), mientras que, la fase estacionaria se compone de moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte, empacada en una columna capilar. La calidad de la separación (resolución) depende de la duración y frecuencia de interacción de los componentes con esta fase, cuya polaridad es una función de sus sustituyentes. La respuesta obtenida se expresa mediante un cromatograma, que consiste en una línea base y un número de picos. Las áreas de los picos permiten las determinaciones cuantitativas, además de que un componente puede identificarse por su tiempo de retención (Scott R. , 2003).

Una de las desventajas de la cromatografía de gases incluye la necesidad de que el analito o un derivado debe ser volátil y estable a la temperatura requerida para el análisis



(en la práctica, por debajo de 400 °C). Además, las sustancias que son altamente polares o con grupos funcionales ionizables pueden dar malos resultados (picos anchos) y generalmente, la muestra necesita algún tipo de tratamiento previo al análisis. Por otro lado, algunos componentes de la muestra pueden ser termolábiles y los productos de descomposición pueden interferir en el análisis (Flanagan, Taylor, Watson, & Whelpton, 2007). La sililación es el procedimiento de derivatización más ampliamente usado para análisis por GC-MS; los derivados obtenidos presentan estabilidad térmica y química, además de alta volatilidad. Algunos agentes derivatizantes de este tipo incluyen: *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), *N*-metil-*N*-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y, *N*-metil-*N*-*tert*,-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA) (Kintz, 2007, pág. 107).

### 2.3.2 Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica utilizada en la determinación de estructuras orgánicas, sola o en combinación con otras técnicas. Se basa en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas volatilizadas, éstos se separan de acuerdo con su masa y su carga y, finalmente se detectan mediante un dispositivo adecuado. El resultado es un espectro de masas que relaciona la abundancia de los diferentes tipos de iones con la relación masa/carga ( $m/z$ ) de cada uno de ellos (Museo Nacional de Ciencias Naturales).

Un espectrómetro de masas consta de: un sistema de introducción de la muestra que será directamente en fase gaseosa si proviene de un cromatógrafo de gases, el cual realiza la separación de los componentes de una mezcla. Una fuente de iones para producir la ionización de la muestra, ya sea por impacto electrónico o químico; en el primero las moléculas son ionizadas por medio de un haz de electrones de elevada energía y en el segundo se utiliza como agente ionizante un ión que va a transferir su carga a la molécula de muestra por medio de una reacción bimolecular. Un analizador para la separación de los iones, los más utilizados son el campo magnético, el cuadrupolo y la trampa de iones. Por último, un sistema detector y registrador. En el interior del espectrómetro debe existir un ambiente de alto vacío para que los iones formados transiten sin colisiones hasta el detector (Flanagan, Taylor, Watson, & Whelpton, 2007).

La espectrometría de masas tiene la posibilidad de dar información acerca de un analito usando menos muestra que otras técnicas. La identificación de una molécula a través de su espectro de masas es mucho más fácil que con otro tipo de información espectral, especialmente con la utilización de bases de datos computarizadas modernas. Una de las desventajas de esta técnica, es que consume la muestra, es decir, que esta se acaba; además, la inversión económica tanto en el equipo como en el entrenamiento de un usuario es alta (Flanagan, Taylor, Watson, & Whelpton, 2007).

### **2.3.3 Validación de una metodología analítica**

La validación es la confirmación por examen y suministro de evidencia objetiva del cumplimiento de los requisitos particulares para un uso específico (NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

El manual “Guidance for Industry – Bioanalytical method validation” (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001), es coherente con los parámetros establecidos por la FDA (Food and Drug Administration) y sirve como pauta en el desarrollo de métodos bioanalíticos para la investigación tanto en el área de la farmacología como de la toxicología; aplica para los procedimientos cromatográficos y espectrométricos, así como para la cuantificación de drogas y sus metabolitos en diferentes matrices biológicas.

Se requiere una *Validación Completa (Full Validation)* ya que la metodología analítica se desarrollaría e implementaría por primera vez en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Los parámetros fundamentales de esta validación incluyen: selectividad, precisión, linealidad y rango, límites de detección y cuantificación, exactitud y, estabilidad.

- **Selectividad**

La selectividad se define como la habilidad que tiene un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito inequívocamente en presencia de otros componentes que podrían encontrarse en la muestra (U.S. Department of Health and Human Services, Food and

Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, July 1999). Las sustancias que interfieren potencialmente en una matriz biológica incluyen componentes endógenos de la matriz, metabolitos, productos de descomposición y medicamentos concomitantes u otros agentes exógenos.

- Precisión

La precisión describe la cercanía de medidas individuales de un analito cuando se aplica repetidamente el procedimiento a múltiples submuestras de una única muestra homogénea. Se evaluó la precisión como: repetibilidad y precisión intermedia. La repetibilidad expresa la precisión bajo las mismas condiciones operacionales en un corto período de tiempo, mientras que, la precisión intermedia expresa las variaciones dentro del laboratorio (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, July 1999).

- Linealidad y rango

El rango de un método es el intervalo entre el valor más bajo y más alto de la sustancia de interés en el que se demuestra que el método es preciso, lineal y exacto. La linealidad de un procedimiento analítico es la habilidad, dentro de un rango dado, de obtener unos resultados directamente proporcionales a la concentración (cantidad) del analito en la muestra (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, July 1999).

- Límites de Detección y Cuantificación

El límite de detección es la cantidad mínima de analito en la muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto, mientras que, el límite de cuantificación es la mínima cantidad de analito en la muestra que puede ser cuantificado con precisión y exactitud adecuadas (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine, July 1999)

- Exactitud

La exactitud de un método analítico describe la cercanía de los resultados promedio obtenidos, a un valor verdadero (concentración) o de referencia del analito (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for

Veterinary Medicine, July 1999). Mide la eficacia de la extracción, la cual no necesariamente es del 100%, aunque los grados de recuperación del analito y del estándar interno deben ser consistentes, precisos y reproducibles.

- Estabilidad

La estabilidad de una droga en una matriz biológica es una función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas de la droga y la matriz (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001).

- Incertidumbre

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser atribuidos al mesurando (magnitud que se está midiendo), se espera con cierta probabilidad que el valor verdadero de la magnitud se encuentre en este intervalo. Al estimar la incertidumbre, deben tenerse en cuenta todos sus componentes, es decir, las fuentes que contribuyen incluyendo: patrones y materiales de referencia, métodos y equipos, condiciones ambientales y operador (NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO/IEC 17025, 2005).

## **2.4 La metodología analítica: Determinación de cocaína en cabello**

### **2.4.1 Recolección de la muestra**

El pelo de la cabeza es la muestra de primera elección. De acuerdo con la SOHT (Society of Hair Testing, 2004), su recolección debe: realizarse por una autoridad responsable respetando los derechos humanos, éticos y legales de la persona a ser evaluada; obtenerse en un ambiente exento de contaminación por drogas, ya que los puntos de corte no son suficientes para descartar la posibilidad de falsos positivos; ser tomada por una persona entrenada, no necesariamente tiene que ser un médico; recolectarse una cantidad suficiente para repetir o confirmar el análisis por otro laboratorio cuando el caso lo requiera; identificarse claramente la raíz (proximal) y la punta (distal) del cabello, importante si se necesita conocer la cronología de consumo,

para lo cual se divide la muestra en segmentos; cortarse de la región posterior de la cabeza, tan cerca como sea posible al cuero cabelludo, ya que es la zona en donde se presenta la menor variación en la tasa de crecimiento del cabello; almacenarse seco protegido de la luz a temperatura ambiente, por lo cual se empaca en papel aluminio y se embala en un sobre de papel; finalmente, rotularse, registrando datos de identificación, color, largo y tratamientos cosméticos comunes.

### **2.4.2 Análisis de porosidad del cabello**

Uno de los temas controversiales en el análisis de drogas en cabello es, la posibilidad de una contaminación externa, por consiguiente, la valoración de la porosidad de las muestras, se hace necesaria. Una forma sencilla de saber si el folículo piloso es poroso y por tanto, susceptible del ingreso de contaminación ambiental, en la que pueden existir partículas de drogas, sobretodo de aquellas que se fuman, como la cocaína, es descrita por Virginia Hill y col. (Hill, Cairns, & Schaffer, 2008), la cual consiste en una tinción con azul de metileno y posterior observación al microscopio; si el agente de tinción ingresa a la estructura del cabello, éste se considera poroso y, se considerará, no apto para el análisis.

### **2.4.3 Análisis de cabello por segmentos**

El análisis de drogas de abuso en cabello por segmentos, proporciona información importante con respecto a la evolución en el tiempo del uso de las mismas por parte de del individuo. La elección de la longitud de cabello a evaluar y su fraccionamiento se establece de acuerdo con el objetivo del análisis, la cantidad de muestra disponible, el tiempo para obtener resultados y los costos. La literatura, en la mayoría de los casos, describe análisis en segmentos de igual longitud (Pragst & Balikova, 2006).

Se reporta que el segmento distal de cabello puede contener solamente un 10% de la droga presente a nivel proximal (Scott K. , 2009), lo que llevaría a obtener un resultado erróneo al analizar la punta del cabello.

#### **2.4.4 Descontaminación de la muestra**

La limpieza inicial de las muestras de cabello es necesaria por dos razones. Primero, para retirar residuos de productos capilares (cremas, champús, lacas), así como también el sudor, el sebo y el polvo que generalmente tiene el cabello y que probablemente incrementará el ruido en la línea base de los análisis. Segundo, para evitar resultados incorrectos debido a la posibilidad de que las drogas presentes en el medio ambiente se adhieran al cabello.

No hay un consenso de un procedimiento para el lavado del cabello, aunque deben tenerse en cuenta aspectos como: los solventes polares apróticos como el diclorometano o la acetona presentan la ventaja de no hinchar el cabello y por ende, no provocan la extracción de materiales, mientras que los solventes polares próticos como el buffer de fosfatos o el metanol, promueven la extracción en el paso del lavado por hinchamiento del cabello (Pragst & Balikova, 2006).

Puesto que el tema de la posible contaminación externa del cabello con la droga que se vaya a buscar, puede provocar un resultado erróneo y confundir una exposición pasiva con un consumo real, debe considerarse un proceso de descontaminación de la muestra previo a la extracción del analito.

La estrategia de descontaminación, de acuerdo con la SOHT, incluye inicialmente un solvente orgánico para la remoción de moléculas grasas, seguido de un solvente acuoso para retirar las sustancias hidrosolubles (Society of Hair Testing, 2004). Los lavados deberán almacenarse para su análisis si es necesario.

#### **2.4.5 Desintegración y extracción de la muestra**

Diferentes procedimientos analíticos pueden producir diferentes resultados cuantitativos. Cada laboratorio es libre de escoger si somete la muestra a una desintegración antes de extraer los analitos o, realiza directamente la extracción sin desintegrar la muestra.

### 2.4.6 Criterios para análisis por espectrometría de masas

El método debe ser validado de acuerdo con las Buenas Prácticas de Laboratorio y la normatividad vigente. El problema de la matriz cabello en comparación con otras matrices como los fluidos biológicos homogéneos, es la preparación de las muestras para dichos estudios de validación debido a la dificultad para dopar el pelo con los analitos de interés. Lo ideal sería obtener suficiente cantidad de cabello de usuarios de drogas para preparar un pool, pero es muy difícil, aunque se puede reemplazar por controles preparados adecuadamente (Kintz, 2007).

### 2.4.7 Criterios para obtener un análisis en cabello positivo

Los siguientes criterios deben tenerse en cuenta cuando se emplea el cabello como una matriz en la búsqueda de drogas:

- ✓ Recolectar el cabello de la parte posterior (vértice) de la cabeza lo más cercano al cuero cabelludo, siendo este extremo el proximal y, diferenciarlo del distal.
- ✓ Realizar el análisis de un segmento de cabello medido.
- ✓ Realizarle un proceso de descontaminación a todas las muestras de cabello.
- ✓ Analizar los lavados buscando la droga de interés.
- ✓ Confirmar los ensayos de tamizaje positivos con métodos alternativos, por ejemplo cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas u otro de igual o mejor especificidad y selectividad.

**Tabla 2-1:** Cutoffs propuestos para diferentes drogas en cabello en análisis de confirmación. Adaptado de Kintz, 2007

Droga	Analito	Cutoff		Observaciones
		ng droga / mg de cabello		
		SAMHSA	SOHT	
Cocaína	Cocaína (COC)	0,5	0,5	<b>SAMHSA:</b> La proporción BE/COC debe ser mayor que 5%, o CE o NC deben estar presentes.
	Benzoilecgonina (BE)	>5% del nivel de COC	0,05	
	Cocaetileno (CE)	0,05	0,05	<b>SOHT:</b> no hace recomendaciones acerca de la proporción BE/COC.
	Norcocaína (NC)	0,05	0,05	

Se recomiendan cuatro criterios para evaluar la posibilidad de contaminación pasiva: Identificación de metabolitos, uso de proporción metabolito/droga, análisis de lavados y valores umbral (threshold) o cutoffs (ver Tabla 2-1). Los metabolitos de cocaína a determinar recomendados son: benzoilecgonina y cocaetileno. La proporción de metabolito/droga recomendada es: benzoilecgonina/cocaína  $>0,05$  (dado que la benzoilecgonina no siempre está presente, deben usarse controles de hidrólisis).

#### **2.4.8 Relación entre la dosis consumida de la droga y la concentración encontrada en el cabello**

Un resultado positivo de un análisis en cabello confirma que una persona ha usado o ha estado expuesta a una droga, mientras que un resultado negativo no significa que no haya habido exposición o consumo.

Es difícil conocer el tiempo de exposición y la extensión del uso de la droga, es necesaria mayor investigación. Para algunas drogas se han realizado estudios clínicos controlados, los cuales han mostrado que sí existe una relación dosis-concentración en cabello.

Por tanto, la credibilidad de los resultados está dada por la calidad con que se realicen los análisis en el laboratorio. Por ejemplo, el análisis en cabello es aceptable en aplicaciones forenses si:

- ✓ Se mantiene la cadena de custodia.
- ✓ Se considera la contaminación externa.
- ✓ Se establece una definición propia de un resultado positivo.
- ✓ Se realizan en laboratorios certificados con metodologías analíticas aceptables.
- ✓ El laboratorio participa en un programa de ensayos de competencia externa, obteniendo un desempeño adecuado y, además tiene un programa de control de calidad y garantía de calidad interna.

Los resultados cuantitativos de cocaína determinados en cabello pueden categorizarse en cuatro niveles, en cuanto a su consumo: uso leve de 0,5 a 3,0 ng/mg, uso moderado de 3,1 a 10,0 ng/mg, uso severo de 10,1 a 40,0 ng/mg y, uso muy severo mayor a 40,0 ng/mg (Tassiopoulos, Bernstein, Heeren, Levenson, Hingson, & Bernstein, 2004).



Los resultados negativos en un análisis de cabello deben evaluarse con precaución, puesto que puede ocurrir que la cantidad de droga consumida no haya sido la suficiente, o durante el período de tiempo necesario para que la droga se incorpore al pelo en la cantidad necesaria para ser detectada (Sánchez Pérez, Enero de 2008). Las drogas recientemente incorporadas desde el torrente sanguíneo al folículo piloso, tardan aproximadamente una semana en emerger del cuero cabelludo, tiempo en que estarán disponibles para recolectarse (Scott K. , 2009) las muestras de cabello, por tanto, según la autora, las muestras tomadas cinco días después de cometida una infracción bajo la influencia de drogas, no contendrá ninguna de las ingeridas en el momento en que se cometió, pero cuando se reportan casos de manera tardía (entre 5 días y un mes), se recomienda hacerlo un mes después de sucedido el incidente. Esto permitirá que cualquier droga incorporada en el cabello se vaya desplazando a medida que éste crece y se garantice su presencia en el primer centímetro más cercano al cuero cabelludo. Igualmente, por experiencia personal se comparte esta sugerencia, teniendo en cuenta cuestiones operativas, referentes a la comodidad tanto de toma como de manipulación de la muestra, pues será más fácil cortar y habrá mayor cantidad de cabello.



## **3. Metodología**

### **3.1 Tipo de investigación**

Se realizó un estudio descriptivo, implementando una metodología analítica en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y, probándola con un grupo de consumidores de drogas.

### **3.2 Ubicación geográfica**

Casa Girasol de la Comunidad Terapéutica Amigoniana San Gregorio, Cota, Cundinamarca.

### **3.3 Población de estudio**

Mujeres drogodependientes entre los 12 y 18 años de edad, en proceso de rehabilitación de la Casa Girasol de la Comunidad Terapéutica Amigoniana San Gregorio, Cota, Cundinamarca. Se consideraron el total de jóvenes presentes el día de la toma de muestra: 27 de abril de 2011. Esto quiere decir, que el criterio de inclusión fue ser consumidor de drogas, información que se corroboró mediante entrevista. De un total de 32 personas, 5 no desearon participar, por tanto, la cantidad neta de muestras tomadas fue de 27. La toma de muestra fue autorizada por el Padre Jacinto Guarín, Director de la Comunidad Terapéutica Amigoniana San Gregorio, mediante oficio PGATI – 128 del 4 de abril de 2011 (ver Anexo A).

## **3.4 Consideraciones éticas**

### **3.4.1 Tipo de investigación**

De acuerdo con la Resolución No. 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y Protección Social, por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, este proyecto se clasificó como Investigación con riesgo mínimo, puesto que la muestra se obtuvo mediante corte de pelo (específicamente cabello), sin causar desfiguración dado que se tomó de la parte posterior de la cabeza evitando que se vea a simple vista.

### **3.4.2 Procedimiento para la toma del consentimiento informado**

Antes de la toma de muestra se requiere obtener el consentimiento informado de cada participante cumpliendo con el siguiente procedimiento:

1. Se explica al sujeto y/o su representante legal brevemente la investigación que se pretende realizar.
2. Se pregunta al sujeto y/o su representante legal si desea participar en la investigación.
3. Se da a conocer el formulario del consentimiento informado al sujeto y/o su representante legal.
4. Se explica al sujeto y/o su representante legal el contenido de dicho formulario.
5. Se solicitan las firmas correspondientes.

### **3.4.3 Texto completo del formulario del Consentimiento Informado**

El texto completo del formulario del *Consentimiento Informado* se muestra en el Anexo B, el cual hace constar la participación voluntaria de cada individuo.

### **3.4.4 Formato de Toma de Muestra**

Además, se requiere el diligenciamiento de un *Formato de toma de muestra* (ver Anexo C) para la obtención de datos importantes para en el análisis de resultados posteriores.

Los documentos anteriormente mencionados, fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional mediante Acta No. 04 del 10 de marzo de 2011 (ver Anexo D).

### 3.5 Materiales y Métodos

Los recursos necesarios en la investigación fueron aportados por: el Laboratorio y el Departamento de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Además, con el apoyo de la División de Investigación Sede Bogotá (DIB) en conjunto con la Facultad de Medicina, mediante la *Convocatoria para el estímulo a la investigación a través de proyectos y trabajos de investigación en los posgrados de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Apoyo en la Investigación en Salud. Facultad de Medicina y Dirección de Investigación Sede Bogotá 2011*, se realizó una pasantía internacional, en un laboratorio de toxicología ubicado en la ciudad de Santiago de Chile en convenio con el Departamento de Medicina Legal de la Universidad de Chile y la Universidad Mayor, con una duración de dos meses, en la cual se recibió entrenamiento en metodologías analíticas para la búsqueda de drogas de abuso en matriz cabello (ver Anexo E).

#### 3.5.1 Equipos

Cromatógrafo de Gases Varian 450 acoplado a un Espectrómetro de Masas de Trampa Iónica Varian 220. Automuestreador Varian CP-8400 e Inyector 1177. Columna cromatográfica 5-MS Varian Factor Four 30m x 0,25 mm; 0,25 µm, Helio Alta Pureza 99,99% como gas de arrastre. Calificación operacional No. 11-AN-037 Quimitrónica Ltda.

Microscopio NIKON ECLIPSE E100 (No.5): facilitado por el Laboratorio de Microbiología – Departamento de Farmacia – Facultad de Ciencias – Universidad Nacional de Colombia.

Balanza analítica digital ACCULAB® LA-200, rango de medición 0.01 g a 200 g.

Bloque de calentamiento (Temp-Blok Module Heater) H 2025-5, Lab-Line Instruments.

Ultrasonido BRANSON 1510 (Branson® Ultrasonic cleaner).

Vortex G-560, Scientific Industries.

Potenciómetro Metrohm Basic AB15 Plus (pH meter), Cole Parmer.

Nevera LG MR472UWY-G.

Estufa WTB BINDER.

Micropipeta Transferpette® S BRAND (10-100 µL).

Micropipeta BOECO Germany (100-1000 µL).

### 3.5.2 Reactivos

Estándares de referencia certificados Cerilliant: Cocaína (analito principal), certificado de análisis C-008. Cocaína-D3 (estándar interno), certificado de análisis C-014. Benzoilecgonina (metabolito principal de cocaína), certificado de análisis B-004.

Agente derivatizante: SILYL-991 (N,O-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA) – trimethylchlorosilane (TMCS) 99:1) Macherey – Nagel.

Matriz: Pool de cabello (obtenido de seis mujeres voluntarias entre los 20 y 30 años, quienes manifestaron no consumir drogas ilícitas) fortalecido con los estándares incorporados, de acuerdo con el procedimiento descrito por Virginia Hill y colaboradores (Hill, Cairns, & Schaffer, 2008), dado que el material de referencia certificado de drogas de abuso en matriz cabello estuvo *fuera de stock* en NIST.

Reactivos grado cromatográfico: Acetato de etilo 99.9% Merck, Diclorometano SupraSolv Merck.

Reactivos analíticos: Hidróxido de sodio 96% May & Baker, Ácido Clorhídrico 0.1N Merck, Tetraborato de Sodio Merck.

Otros reactivos: Azul de metileno al 0.5%.

### 3.5.3 Optimización de la metodología analítica

Inicialmente se llevó a cabo una revisión bibliográfica acerca de las diferentes metodologías analíticas utilizadas para la extracción y análisis de cocaína y sus metabolitos en la matriz biológica cabello, de las cuales se ensayaron cuatro (Cognard,

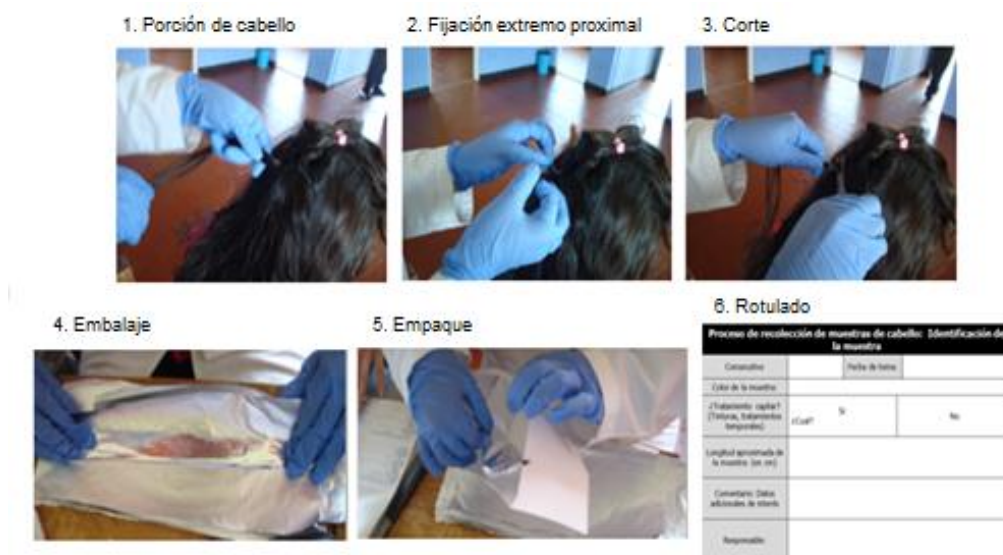
Rudaz, Bouchonnet, & Staub, 2005; Lachenmeier, Musshoff, & Madea, 2006; Cordero & Paterson, 2007; Riveros Toledo & Martínez Ramírez, 2008), para finalmente seleccionar la de mejor desempeño en el laboratorio (Riveros Toledo & Martínez Ramírez, 2008). Esta etapa de la investigación se desarrolló junto con dos estudiantes de la carrera de Farmacia de Universidad Nacional de Colombia, quienes la presentaron como trabajo de grado para optar al título de Química Farmacéutica.

Se tomaron 27 muestras de cabello adoptando los criterios establecidos por la SOHT para este procedimiento, descritos en el numeral 2.4.1 de este documento. De éstas, se utilizaron 5, escogidas por su historia de uso de cocaína descrita en la entrevista, para realizar los ensayos que permitieron elegir aquella con la que se obtuvo la mejor respuesta cromatográfica a dicho analito.

Los protocolos tanto para la toma de muestras de cabello como para el tratamiento de descontaminación, extracción, purificación e identificación de cocaína a partir de muestras de cabello, fueron elaborados por las estudiantes en mención (Bejarano & Ruiz, 2011).

#### ▪ Proceso de Toma de Muestra

**Figura 3-1:** Proceso de toma de muestra. Fotos: William Quevedo. Diseño del rótulo: Mónica Bejarano



El proceso de toma de muestra, se ilustra en la **Figura 3-1**; fue realizado por un profesional entrenado, en un área libre de contaminación ambiental por drogas, se tomó una porción de 5-10 mm de diámetro, se fijó el mechón con una banda identificando la raíz, se cortó de la región posterior de la cabeza, muy cerca al cuero cabelludo; estando seco, se almacenó en papel aluminio para proteger de la luz, se embolsó en un sobre de papel y se rotuló, registrando consecutivo, fecha, color, tratamientos cosméticos y longitud.

#### ▪ Tratamiento de la muestra

Se realizaron algunas modificaciones en el segundo protocolo mencionado, por lo cual, se describe a continuación y se ilustra en la Figura 3-2.

**Figura 3-2:** Tratamiento de la muestra de cabello para extraer cocaína. Fotos de 2 a 7 tomadas por Victor Manuel Holguín - Unimedios



La tinción inicial de las muestras de cabello con azul de metileno y observación bajo el microscopio, para seleccionar las muestras aptas para el análisis, no tuvo cambios. En el



punto 1 de la Figura 3-2 se da el ejemplo de una muestra apta y una no apta para análisis. Posteriormente, se dividieron en segmentos de 3 cm y se tomaron los tres primeros segmentos (proximales), con el fin de conocer la historia de uso de cocaína de aproximadamente nueve meses. Se lavaron las muestras, dos veces con 5 mL de diclorometano a 35 °C durante 5 minutos cada una; estos lavados se recolectaron y se analizaron en el GC-MS hasta garantizar la ausencia de cocaína debida a la posible contaminación externa. Las muestras se secaron en estufa durante 15 minutos a 60°C. Para facilitar la manipulación de las muestras, se cortaron en segmentos muy pequeños (alrededor de 1,0 mm), se pesaron entre 30 y 70 mg y, se sometieron a digestión ácida controlada a 70°C, para evitar la hidrólisis de la cocaína, con 2 mL de ácido clorhídrico 0,1 N durante 16 horas. Al finalizar este tiempo, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se filtraron, para luego, realizar la extracción de los analitos de interés, previo ajuste a pH 10 con 4 mL de solución saturada de tetraborato de sodio y 2 mL de NaOH 0,1 N y, adición del estándar interno (cocaína-D3). Se realizó una extracción líquido-líquido (L-L) utilizando 4 mL de diclorometano y agitación durante 15 minutos. Finalmente la fase orgánica se llevó a sequedad y se reconstituyó con 150 µL de acetato de etilo para inyectar la muestra en el GC-MS.

- Condiciones Cromatográficas

**Tabla 3-1:** Condiciones cromatográficas de trabajo

Generales		
Temperatura Trampa Iónica (°C)		220,0
Temperatura Manifold (°C)		50,0
Temperatura Línea de Transferencia (°C)		280,0
Inyector		
Temperatura (°C)		250,0
Volumen de inyección (mL)		1,0
Liner recto (mm)		2,0
Velocidad de inyección (µL/s)		1,0
Tiempo preinyección (s)		2,0
Fase Móvil		
Flujo constante (mL/min)		1,5
Relación de split		
Tiempo	Estado de Split	RelaciónSplit
Inicial	Encendido	50
0,00	Apagado	Apagado
0,75	Encendido	100

**Tabla 3-1:** (Continuación)

Programación del Horno			
Temperatura (°C)	Relación (°C/min)	Mantener (min)	Total (min)
180,0	-	1,00	1,00
280,0	10,0	3,00	14,00

Se establecieron las condiciones cromatográficas que se relacionan en la **Tabla 3-1**, para el análisis de cocaína en cabello, el cual se llevó a cabo en modo full scan. El método se identificó con el nombre de *Cocaína en cabello*.

**Tabla 3-2:** Tiempos de retención de cocaína y cocaína-D3

Inyección	Tiempo de retención (min)	
	Cocaína	Cocaína-D3
1	9,720	9,706
2	9,720	9,703
3	9,723	9,704
4	9,720	9,706
5	9,720	9,703
6	9,723	9,704
7	9,720	9,706
8	9,720	9,703
9	9,723	9,704
10	9,720	9,706
<b>Promedio</b>	<b>9,721</b>	<b>9,705</b>
<b>Desviación estándar</b>	0,0014	0,0014
<b>CV (%)</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,01%</b>

De igual manera, los tiempos de retención se definieron mediante diez inyecciones de los estándares de cocaína y cocaína-D3, a una concentración de 20 ppm. En la Se establecieron las condiciones cromatográficas que se relacionan en la **Tabla 3-1**, para el análisis de cocaína en cabello, el cual se llevó a cabo en modo full scan. El método se identificó con el nombre de *Cocaína en cabello*.

**Tabla 3-2** se relacionan los valores cuyos coeficientes de variación no sobrepasaron la especificación de  $\leq 1.0\%$

### 3.5.4 Validación de la metodología analítica

La *Validación Completa* de la metodología analítica se realizó de acuerdo con el manual “Guidance for Industry – Bioanalytical method validation” (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM), May 2001).

Los parámetros evaluados en esta validación incluyeron: selectividad, precisión, linealidad y rango, límites de detección y cuantificación, exactitud y, estabilidad.

- Cálculo de Incertidumbre

Se calculó la incertidumbre de la medida, es decir, de la cantidad de cocaína encontrada en cada muestra analizada, expresada como ng/mg de cabello.

### 3.5.5 Aplicación de la metodología analítica

- Estudio de segmentos de cabello y definición de la historia de consumo

Se valoró la integridad de cada una de ellas muestras mediante la tinción con azul de metileno y observación bajo el microscopio, se fijaron las imágenes mediante fotografía. De esta manera se eligieron aquellas aptas para el análisis. Se definió la longitud total a analizar para cada muestra, teniendo en cuenta la de menor largo, con el fin de unificar la medida; asimismo, se estableció el fraccionamiento de cada mechón de cabello.

Posteriormente, se sometieron los segmentos de pelo al tratamiento para la extracción de los analitos de interés, por tandas, de acuerdo con la capacidad de trabajo del investigador; finalmente, se inyectaron los extractos en el GC-MS, organizando secuencias de un número adecuado de muestras junto con sus respectivos controles.

Se extrajeron los resultados gráficos (cromatogramas y espectros de masas) y numéricos (relación de áreas cocaína/cocaína-D3) y, realizaron los cálculos respectivos a la concentración de cocaína en el pelo en unidades de ng de cocaína / mg de cabello, con su respectiva incertidumbre.

Mediante una estadística descriptiva, se describió la historia de consumo general y de cada individuo.

## 4. Resultados y Discusión

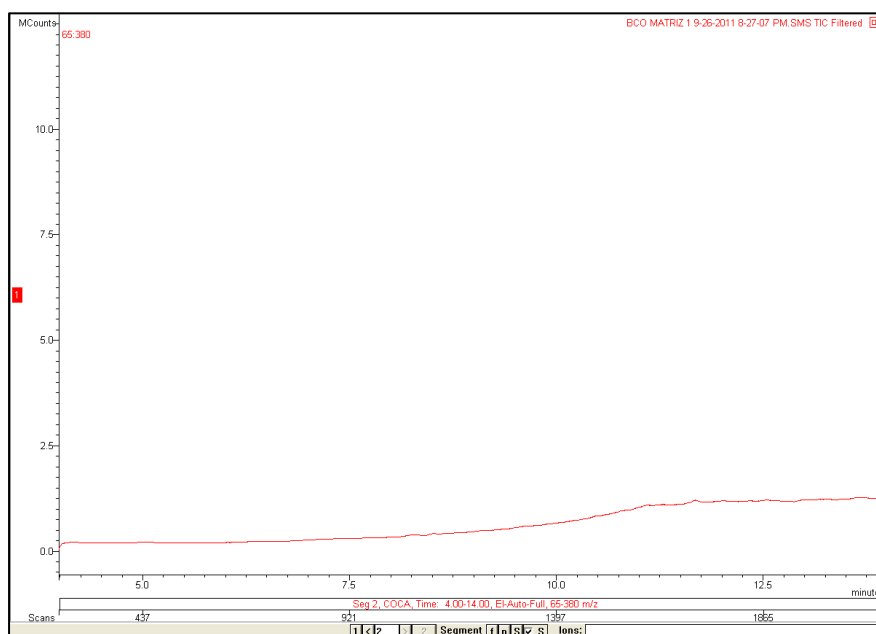
Garantizando la confiabilidad de los resultados analíticos, el equipo de GC-MS fue calificado el 5 de agosto de 2011 por QUIMITRÓNICA LTDA. El informe de calificación operacional se encuentra disponible en el Laboratorio de Toxicología – Facultad de Medicina – Universidad Nacional de Colombia). El resultado de la calificación fue *CONFORME*.

### 4.1 Validación de la metodología analítica

Los datos crudos para el cálculo de los parámetros de validación se encuentran consolidados en los cuadros debidamente identificados en el Anexo D. Los resultados de cada parámetro evaluado se describen a continuación.

#### 4.1.1 Selectividad

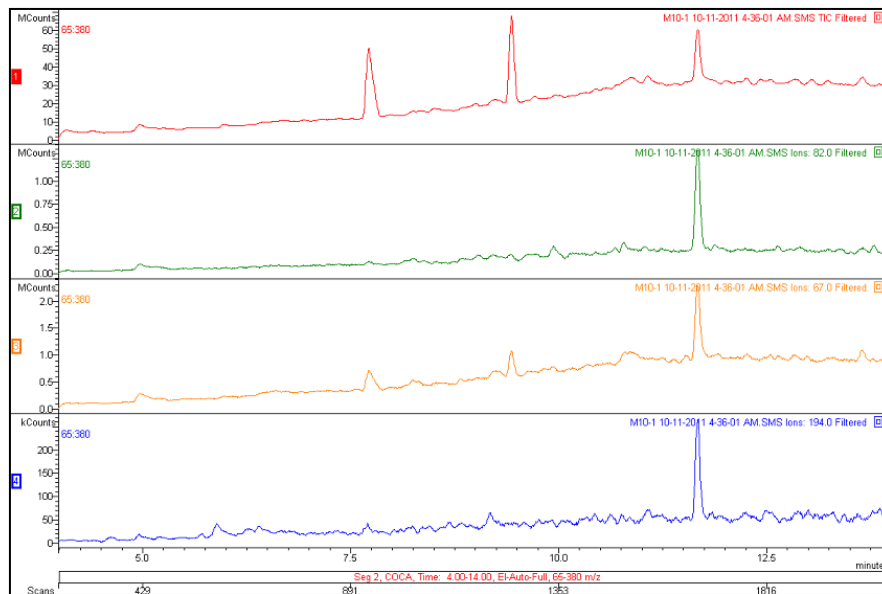
**Figura 4-1:** Cromatograma blanco de matriz



Se analizaron seis muestras blanco obtenidas de mujeres voluntarias quienes no consumen drogas ilícitas. Los cromatogramas obtenidos no muestran interferentes en el tiempo de retención de la cocaína ni del estándar interno, como se observa en la **Figura 4-1**, por tanto, cumple con el criterio de aceptación, puesto que no se rechazó ninguno de ellos.

Además, en los cromatogramas de las muestras tomadas, no se observa ninguna sustancia que salga en el tiempo de retención de la cocaína, como se muestra en la Figura 4-2, conociendo previamente que los sujetos a quienes pertenecen dichas muestras han sido policonsumidores; entre las sustancias de consumo diferentes a la cocaína, se encuentran: inhalantes, marihuana, benzodiacepinas (clonazepam), éxtasis (MDMA), cigarrillo, alcohol y medicamentos con fines terapéuticos como el omeprazol. Se filtraron los iones característicos de las sustancias que pueden extraerse junto con la cocaína y se observó que ninguna interfería con el analito de interés.

**Figura 4-2:** Cromatograma de la muestra 10 (M10), sin interferentes en el tiempo de retención de la cocaína. 1) TIC de M10. 2-3-4) Iones característicos de la cafeína



Por otra parte, se programó el método para identificar y cuantificar el analito de interés cumpliendo con la presencia de tres de sus iones característicos (82, 182 y 303), dado que moléculas como la cafeína, presentan en su espectro el ión 82; en la

Figura 4-2 también se muestran los iones característicos de esta sustancia de uso común.

Cumpliendo con los criterios anteriormente descritos, se concluyó que el método es selectivo.

### 4.1.2 Precisión

#### ▪ Repetibilidad

Las determinaciones se realizaron el mismo día, por el mismo analista y con el mismo equipo GC-MS. Se evaluaron, para el sistema cromatográfico y el método, tres niveles de concentración: bajo de 0,5 µg/mL, medio de 10,0 µg/mL y alto de 40,0 µg/mL, seis réplicas por nivel. El criterio de aceptación se basa en los coeficientes de variación, los cuales no deben exceder el 15%, excepto en el nivel más bajo, que puede ser hasta 20%.

En la **Tabla 4-1** se presentan los resultados de la repetibilidad en sistema y método expresados como coeficientes de variación.

**Tabla 4-1:** Repetibilidad en sistema y método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Coeficiente Variación	
		Sistema	Método
1	0,50	8,5317	10,5981
2	10,00	1,9786	3,6176
3	40,00	0,8646	9,4497

Los coeficientes de correlación hallados para los tres niveles de concentración, se encuentran dentro de los parámetros establecidos.

#### ▪ Precisión Intermedia

El mismo ensayo de repetibilidad se realizó para evaluar la precisión intermedia, pero hecho por dos analistas, durante tres días cada uno y, utilizando el mismo equipo GC-MS. Asimismo, el criterio de aceptación se basa en los coeficientes de variación, los

cuales no deben exceder el 15%, excepto en el nivel más bajo, que puede ser hasta 20%.

Los resultados de la precisión intermedia en sistema y método se encuentran en la **Tabla 4-2**, expresados como coeficientes de variación globales.

**Tabla 4-2:** Precisión Intermedia del Sistema y del Método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Coeficiente Variación Global	
		Sistema	Método
1	0,50	7,2885	7,8808
2	10,00	2,3004	3,0249
3	40,00	4,7661	7,7770

Los coeficientes de variación hallados se encuentran dentro de los parámetros establecidos para cada nivel de concentración. La comparación de los datos de los tres días se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) para cada nivel, encontrando que no hay diferencias entre los días 1, 2 y 3, ni entre los dos analistas. La Tabla 4-3 muestra los resultados obtenidos.

**Tabla 4-3:** ANOVA para Precisión Intermedia

Nivel	Concentración (µg/mL)	CV global		F crítico	F calculado	
		Sistema	Método		Sistema	Método
1	0,50	7,2885	7,8808	2,6207	1,4637	1,5074
2	10,00	2,3004	3,0249		0,5853	0,5028
3	40,00	4,7661	7,7770		2,4857	0,5525

Interpretación: Los valores de F calculados son menores al F crítico, por tanto, no se rechaza  $H_0$  y se asume que no hay diferencias entre los días 1, 2 y 3.

Al cumplir con la repetitividad y la precisión intermedia, se concluye que el método es preciso.

### 4.1.3 Linealidad y Rango

La curva de calibración es la relación entre la respuesta instrumental y concentraciones conocidas del analito. Contiene una muestra blanco sin estándar interno, una muestra blanco con estándar interno y al menos seis niveles que cubran el rango de

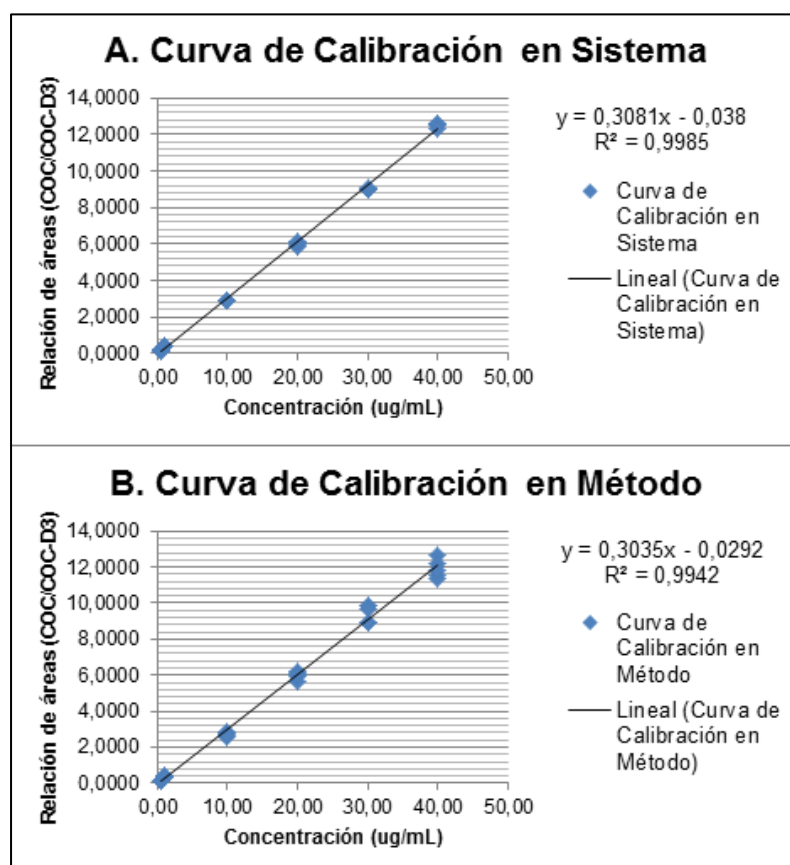


concentraciones esperado, incluyendo el límite de cuantificación. En este caso, las concentraciones elegidas fueron en  $\mu\text{g/mL}$ : 0.50, 1.00, 10.00, 20.00, 30.00 y 40.00.

El modelo que describe esta relación es una regresión de mínimos cuadrados, cuyas gráficas se muestran en la **Figura 4-3**.

Se realizaron pruebas de hipótesis para el intercepto, la pendiente y el coeficiente de correlación, de las curvas de calibración en sistema y método, cuyos datos y resultados se muestran en la Tabla 4-4.

**Figura 4-3:** Curvas de calibración en A. Sistema y B. Método



La prueba de hipótesis para el Intercepto arrojó un  $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabla}}$ , por tanto, no se rechazó  $H_0$  y, se asumió que las rectas presentan convergencia al origen.

La prueba de hipótesis para la Pendiente mostró un  $t_{b\ experimental} > t_{tabla}$ , por consiguiente, se rechazó  $H_0$ , es decir, las pendientes fueron significativamente diferentes de cero.

Tanto la pendiente como el intercepto de la curva de calibración del método, caen dentro de los límites de confianza de la pendiente y el intercepto respectivamente, de la curva de calibración del sistema; esto hace que estas dos curvas sean comparables, además se demuestra que no hubo interferencia de la matriz en los resultados.

La prueba de hipótesis para el Coeficiente de Correlación exhibió un  $t_{r\ experimental} > t_{tabla}$ , lo cual llevó a rechazar  $H_0$ , asumiendo que hay correlación entre la concentración y la respuesta cromatográfica y, que se las curvas presentaron linealidad.

Finalmente, se realizó un análisis de varianza para las curvas de calibración en sistema y método, cuyos resultados se consignan en la **Tabla 4-5**.

**Tabla 4-4:** Datos y resultados de la pruebas de hipótesis para intercepto, pendiente y coeficiente de correlación, de las curvas de calibración para sistema y método

Parámetro	Sistema	Método
Sxx	6421,0417	6421,0417
Sxy	1978,2279	1948,9777
Sa intercepto	0,0504	0,0983
Sb pendiente	0,0023	0,0044
Intercepto	-0,0380	-0,0292
LCI intercepto	<b>-0,1411</b>	-
LCS intercepto	<b>0,0652</b>	-
Pendiente	0,3081	0,3035
LCI pendiente	<b>0,3035</b>	-
LCS pendiente	<b>0,3127</b>	-
Coeficiente de correlación	0,9985	0,9942
$t_{b\ experimental}$	136,7863	69,0933
$t_{a\ experimental}$	-0,7535	-0,2974
$t_{r\ experimental}$	136,7863	69,0933
$t_{tabla}$	2,0484	2,0484

El análisis de varianza para la regresión mostró que el  $F_{experimental} > F_{tabla}$ , por tanto, se rechazó  $H_0$ , es decir, existe correlación entre la concentración y la respuesta cromatográfica, tanto en la curva de calibración en sistema como en método.

El análisis de varianza para la linealidad arrojó que el  $F_{\text{experimental}} < F_{\text{tabla}}$ , es decir, no se rechazó  $H_0$ , asumiendo que no se presentó desvío en la linealidad de ambas curvas de calibración.

**Tabla 4-5:** Análisis de varianza para las curvas de calibración en sistema y método

Fuente de variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F exp	F tab
<b>Sistema</b>					
<b>Regresión</b>	1	609,46	609,46	62,07	5,72
<b>Linealidad</b>	4	0,81	0,20	0,02	3,38
<b>Error</b>	24	235,66	9,82		
<b>Método</b>					
<b>Regresión</b>	1	591,41	591,41	60,86	5,72
<b>Linealidad</b>	4	1,18	0,29	0,03	3,38
<b>Error</b>	24	233,21	9,72		

El método es lineal en el rango de concentraciones de 0,69 a 60,00 ng/mg de cabello.

#### 4.1.4 Límite de Detección y Cuantificación

Estos parámetros se calcularon utilizando las curvas de calibración para sistema y método, unas segundas curvas de concentraciones bajas en sistema y método, incluyendo 0.10, 0.25 y 0.50 µg/mL y, unas terceras curvas graficando las desviaciones estándar de las curvas anteriores.

**Tabla 4-6:** Datos para el cálculo del límite de detección y cuantificación

Curva	a (Intercepto)	b (Pendiente)	Ecuación	n
Sistema				
Concentraciones altas	-	0,3081	y = 0,3081x - 0,0380	-
Concentraciones bajas	0,0968	-	y = 0,3320x + 0,0968	18
Desviaciones estándar	0,0215	-	y = 0,0020x+0,0215	-
Límite de Detección	0,1283 µg/mL = 0,1925 ng/mg			
Método				
Concentraciones altas	-	0,3035	y = 0,3035x - 0,0292	-
Concentraciones bajas	0,1512	-	y = 0,1323x + 0,1512	18
Desviaciones estándar	0,0442	-	y = 0,0118x + 0,0442	-
Límite de Cuantificación	0,4605 µg/mL = 0,6908 ng/mg			

Los resultados se consignaron en la **Tabla 4-6**, y fueron utilizados para calcular tanto el límite de detección como el límite de cuantificación, cuyos valores en unidades de ng/mg de cabello fueron 0,19 y 0,69 respectivamente. De acuerdo con el límite de cuantificación obtenido, un resultado positivo para cocaína, utilizando esta metodología implementada, sería mayor o igual a este valor, pues se garantiza la precisión y exactitud de la medida.

#### 4.1.5 Exactitud

Se calculó mediante comparación de las pendientes de las curvas de calibración del sistema y del método, evaluando de esta manera todo el rango lineal. Se obtuvo un 98% de recuperación.

#### 4.1.6 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de los analitos a largo plazo, a corto plazo y, del analito en una solución stock.

- Estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente

**Tabla 4-7:** Estabilidad de la cocaína extraída de cabello a corto plazo a temperatura ambiente

Solución stock	No. Inyecciones	t <sub>0</sub> (0 horas)	t <sub>1</sub> (6 horas)	t <sub>2</sub> (12 horas)
<b>Cocaína (10 µg/mL)</b>	Inyección 1	1058000	1024889	824889
	Inyección 2	1305000	1200926	1100926
	Inyección 3	1193000	1089150	789150
	Promedio	1185333	1104988	904988
	Porcentaje de la concentración inicial	100	93,22	76,35
	<b>Pérdida de analito (%)</b>	<b>0,00</b>	<b>6,78</b>	<b>23,65</b>
<b>Cocaína-D3 (10 µg/mL)</b>	Inyección 1	674749	633731	533731
	Inyección 2	840560	820180	720180
	Inyección 3	765366	709604	509604
	Promedio	760225	721172	587838
	Porcentaje de la concentración inicial	100	94,86	77,32
	<b>Pérdida de analito (%)</b>	<b>0,00</b>	<b>5,14</b>	<b>22,68</b>

Tres alícuotas de una concentración intermedia (10.00 µg/mL), tanto del analito de interés como del estándar interno, se mantuvieron de cero (0) a doce (12) horas (basado

en el tiempo que se espera se mantendrán las muestras a temperatura ambiente o en el automuestreador) y se analizaron.

La Tabla 4-7 relaciona los resultados obtenidos, que evidencian pérdida de la molécula menor a un 7% en las primeras 6 horas de análisis, mientras que es mucho mayor, si este tiempo se extiende a 12 horas. Por tanto, las corridas cromatográficas que se programen, no podrán exceder las 24 inyecciones, dado que cada una tarda 14.0 minutos.

- Estabilidad a largo plazo

Aunque la literatura reporta estabilidad muy amplia de diferentes moléculas en la matriz cabello, es importante establecer la estabilidad del analito en muestras de cabello fortalecidas con el mismo, en las condiciones del laboratorio, durante el tiempo de almacenamiento mayor, al de almacenamiento de dichas muestras.

Se determinó con tres alícuotas de dos concentraciones, baja (0,50 µg/mL) y alta (20,00 µg/mL) en tres ocasiones diferentes (semana 1, 2 y 3); los resultados se compararon con los valores encontrados inicialmente, el primer día de los ensayos de estabilidad (semana 0). Estos se plasmaron en la **Tabla 4-8** junto con los resultados, expresados como porcentaje de concentración inicial de cocaína.

**Tabla 4-8:** Estabilidad a largo plazo de la cocaína en matriz fortalecida

Relación de Áreas Cocaína/Cocaína-D3				
Concentración (µg/mL)	Semana0	Semana1	Semana2	Semana3
0,50	0,1872	0,1823	0,1714	0,1820
0,50	0,1841	0,1790	0,1992	0,1966
0,50	0,1858	0,1761	0,1897	0,1847
Promedio	0,1857	0,1791	0,1868	0,1877
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	<b>100,00</b>	<b>96,47</b>	<b>100,58</b>	<b>101,11</b>
20,00	5,9983	5,4308	5,0845	5,6030
20,00	6,1580	4,9438	5,3466	5,5673
20,00	6,2628	5,1907	5,1039	5,6908
Promedio	6,1397	5,1884	5,1783	5,6204
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	<b>100,00</b>	<b>84,51</b>	<b>84,34</b>	<b>91,54</b>

En las cuatro semanas evaluadas no se observan cambios significativos en la concentración de cocaína en las muestras de cabello fortalecidas en el laboratorio, por tanto, se garantiza su estabilidad durante este período de tiempo.

No se evaluó la estabilidad después de experimentar ciclos de congelación y descongelación, dado que el almacenamiento de la muestra de cabello se realiza a temperatura ambiente, es decir, no se somete a temperaturas de refrigeración o congelación.

▪ Estabilidad de la solución stock y estándar interno

La estabilidad de la solución stock de 20 µg/mL y, el estándar interno a la misma concentración, se evaluaron a temperatura ambiente y en refrigeración (2 a 8 °C) durante cuatro semanas. Al transcurrir cada semana de almacenamiento, se valoró la estabilidad comparando la respuesta del equipo con la de la solución inicial, expresando los resultados como el porcentaje de pérdida o ganancia de analito en la solución, como se muestra en la **Tabla 4-9** y **Tabla 4-10**, correspondientes al analito y al estándar interno, respectivamente.

**Tabla 4-9:** Estabilidad de la solución stock de cocaína

COCAINA (20 µg/mL)	Área Cocaína			
	Semana0	Semana1	Semana2	Semana3
<b>Refrigeración 2-8 °C</b>				
Inyección 1	3332000	3194000	3325000	3185000
Inyección 2	3061000	3246000	3072000	3236000
Inyección 3	3061000	3180000	3072000	3202000
Promedio	3151333	3206667	3156333	3207667
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	100	101,76	100,16	101,79
<b>Porcentaje de Pérdida/Ganancia de analito</b>	<b>0,00</b>	<b>-1,76</b>	<b>-0,16</b>	<b>-1,79</b>
<b>Temperatura ambiental</b>				
Inyección 1	3995000	3895000	3057000	3050000
Inyección 2	3995000	3895000	3149000	3131000
Inyección 3	3332000	3325000	3255000	3236000
Promedio	3774000	3705000	3153667	3139000
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	100	98,17	83,56	83,17
<b>Porcentaje de Pérdida/Ganancia de analito</b>	<b>0,00</b>	<b>1,83</b>	<b>16,44</b>	<b>16,83</b>

La solución stock de cocaína, puede almacenarse durante cuatro semanas en refrigeración con una ganancia de analito menor a 2%, posiblemente por evaporación del solvente. A temperatura ambiente sucede lo contrario, hay pérdida de analito menor al 2% durante las dos primeras semanas, pero se incrementa enormemente al transcurrir tres y cuatro semanas, por tanto, no es adecuado almacenarla en estas condiciones.

Con el estándar interno en solución ocurre la misma situación de incremento en la concentración almacenado bajo refrigeración y disminución a temperatura ambiente. Sin embargo, en ambas situaciones esta ganancia o pérdida de analito es menor al 2% solo en la segunda semana, ya en la tercera y cuarta es mucho mayor. De esta manera, la dilución de estándar interno debe almacenarse únicamente durante dos semanas o, preferiblemente prepararse el día que va a ser utilizado.

**Tabla 4-10:** Estabilidad del estándar interno en solución

COCAINA-D3 (20 µg/mL)	Area Cocaína-D3			
	Semana0	Semana1	Semana2	Semana3
<b>Refrigeración 2-8 °C</b>				
Inyección 1	998058	987756	1203000	1213000
Inyección 2	960891	950552	1361000	1363000
Inyección 3	960891	950552	1339000	1341000
Promedio	<b>973280</b>	<b>962953</b>	<b>1301000</b>	<b>1305667</b>
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	100	98,94	133,67	134,15
<b>Porcentaje de Pérdida/Ganancia de analito</b>	<b>0,00</b>	<b>1,06</b>	<b>-33,67</b>	<b>-34,15</b>
<b>Temperatura ambiental</b>				
Inyección 1	1138000	1132000	1074000	1073000
Inyección 2	1188000	1177000	1074000	1073000
Inyección 3	1271000	1271000	998058	987756
Promedio	<b>1199000</b>	<b>1193333</b>	<b>1048686</b>	<b>1044585</b>
<b>Porcentaje de concentración inicial de cocaína</b>	100	99,53	87,46	87,12
<b>Porcentaje de Pérdida/Ganancia de analito</b>	<b>0,00</b>	<b>0,47</b>	<b>12,54</b>	<b>12,88</b>

#### 4.1.7 Incertidumbre

Para calcularla se tuvieron en cuenta los siguientes pasos:

- Se identificaron las fuentes que afectan la incertidumbre

**Tabla 4-11:** Incertidumbre de la medida

Fuente de incertidumbre	Condiciones involucradas	Instrumentos	Parámetro	Valor	Incertidumbre calculada
Estándar certificado de cocaína (Us)			Concentración (mg/mL)	1,000	0,0034641
			Incertidumbre certificada	0,006	
Diluciones del estándar	Temperatura de la solución	Balón volumétrico	Coeficiente de expansión térmica del agua	0,00021	0,0000242
			Temperatura de referencia (°C)	20	
			Temperatura ambiente (°C)	22	
			Capacidad (mL)	2	
	Calibración del balón		Límite de Tolerancia	0,025	0,0144338
	Paralaje (llenado) del balón		Desviación estándar	0,0117342	0,0037107
	Incertidumbre Total debida a dos diluciones del estándar (Ud)				0,0298062
	Pipeta automática de 10-100 µL (Up1)		Volumen (mL)	0,100	0,000127
			Desviación estándar	0,0002201	
	Pipeta automática de 100-1000 µL (Up2)		Volumen (mL)	1,000	0,000476
			Desviación estándar	0,0008250	
Pesaje de la muestra (Uw)		Balanza analítica	Peso de la muestra (g)	0,100	0,0001732
			Linealidad	0,0003	
Volumen de reconstitución de la muestra (Uv p1)		Pipeta automática de 10-100 µL	Volumen (mL)	0,1500	0,000127
			Desviación estándar	0,0002201	
Función de calibración (Ucal)	Curva de calibración método		Número de mediciones para determinar Co	6	0,003127
			Número de mediciones para las curvas de calibración	30	
			Media de estándares de calibración	16,92	
			Desviación estándar residual	0,0043930	
			Pendiente	0,3035	
			Co: Límite de cuantificación (ug/mL)	0,4605	
			Límite de cuantificación (ng/mg)	0,6908	
			Sxx	6459,9726	
Incertidumbre combinada (Uc)			Factor de cobertura (k)	2	0,0078
Incertidumbre expandida (U)			Expresada en ug/mL		0,0156
			Expresada en ng/mg		0,0234
Reporte del resultado del límite de cuantificación				0,6908 ± 0,0234 ng/mg	

- b) Se realizaron las repeticiones de los ensayos experimentales para calcular la desviación estándar y la incertidumbre estándar debida a cada fuente.



- c) Se calcularon las incertidumbres combinadas para estimar la incertidumbre combinada del método.
- d) Se calculó la incertidumbre expandida  $U$ , con un nivel de confianza del 95% y el factor de cobertura. Los resultados se resumen en la **Tabla 4-11**.

En el caso del límite de cuantificación 0.6908 ng/mg de cabello, le corresponde una incertidumbre de 0.0234 ng/mg. En este sentido, se calculó la incertidumbre de cada uno de los valores cuantificados de cocaína en las muestras de estudio (ver Tabla 4-12), de acuerdo con el peso de cada segmento de cabello analizado.

## 4.2 Aplicación de la metodología analítica

- Estudio de segmentos de cabello y definición de la posible historia de consumo

Al teñir las muestras de cabello y observar bajo el microscopio, se encontró que todas las muestras conservaban su integridad, por tanto, fueron aptas para el análisis, ya que en ninguna se detectó el ingreso de azul de metileno. En la publicación de Virginia Hill y colaboradores (Hill, Cairns, & Schaffer, 2008), se describe la comparación de dos muestras del mismo cabello sometidas a contaminación con cocaína, mientras que aquella muestra intacta permitió ingresar una mínima cantidad de la droga eliminada fácilmente con el lavado, la otra muestra que previamente sufrió un proceso capilar, permitió la penetración de la cocaína a gran escala. Como ejemplo se consideran las imágenes bajo el microscopio de una muestra de cabello no tinturado y una de cabello tinturado en la Figura 4-4; como se observa, la tintura no ha causado ningún daño aún, en la cutícula de la muestra 19.

**Figura 4-4:** Imágenes de cabello bajo el microscopio después de la tinción con azul de metileno



Teniendo en cuenta que la muestra más corta fue la número 11 (M11), de 12 cm, se decidió unificar esta longitud para las 27 muestras. Se dividieron en segmentos de 3.0 cm y para el análisis se consideraron los primeros 3 segmentos, es decir, los más cercanos al cuero cabelludo, para un total de 9.0 cm; de esta manera fue posible establecer una cronología de consumo de cocaína alrededor de los últimos nueve meses. No se tuvo en cuenta el último segmento (distal), dado que a esta distancia ya se reporta posible pérdida en el contenido de drogas en cabello. Lo anterior se demostró con el estudio de dihidrocodeína en el cabello de un hombre en tratamiento crónico, mencionado por Karen Scott (Scott K. , 2009), donde se encontró que este fármaco fue detectable, aun cuando el cabello había crecido durante tres años, sin embargo, la porción distal contenía solo el 10% del nivel del extremo proximal.

Los lavados de las muestras se realizaron con dos porciones de diclorometano. Los análisis ejecutados por Skender y colaboradores, con respecto a la limpieza de la matriz cabello previa a la extracción de drogas, mostraron que el tercer lavado con diclorometano siempre era negativo, aun cuando los dos lavados previos hayan sido positivos (Skender, Karacic, Brcic, & Bagaric, 2002). Se analizaron los lavados de cada una de las muestras, de los cuales, solamente en uno (muestra 10, segmento 2) se detectó cocaína, por tanto, se realizó el procedimiento de lavado nuevamente, suficiente para eliminar la contaminación, obteniéndose un resultado “no detectado” para cocaína en el GC-MS para el tercer lavado.

Se realizaron un total de 81 análisis correspondientes a los primeros 3 segmentos (proximales) de las 27 muestras tomadas. Se prepararon y analizaron grupos de 18 segmentos por semana siguiendo la secuencia: control positivo (nivel de concentración bajo), blanco de reactivos, blanco de matriz y muestras, para una corrida de alrededor de 5 horas y media, teniendo en cuenta que no puede exceder las 6 horas donde se garantiza la estabilidad del analito y el estándar interno, durante su permanencia en el automuestreador. Para aquellas muestras en que se detectó cocaína, se realizó un análisis de confirmación individual, siguiendo la secuencia: blanco de reactivos, blanco de matriz, muestra, blanco de matriz y control positivo, asegurando que no haya contaminación cruzada.

**Tabla 4-12:** Contenido de cocaína en las muestras de cabello de los sujetos de estudio

Muestras	Segmento1 (1-3mes)		Segmento2 (4-6mes)		Segmento3 (7-9mes)	
	Concentración de cocaína (ng/mg de cabello)	Incertidumbre de la medida (±)	Concentración de cocaína (ng/mg de cabello)	Incertidumbre de la medida (±)	Concentración de cocaína (ng/mg de cabello)	Incertidumbre de la medida (±)
M1	ND <sup>a</sup>	NA <sup>b</sup>	ND	NA	< 0,6908	NA
M2	< 0,6908	NA	ND	NA	ND	NA
M3	ND	NA	1,2232	0,1334	1,2452	0,1504
M4	1,3158	0,1602	< 0,6908	NA	ND	NA
M5	ND	NA	1,0600	0,1127	ND	NA
M6	ND	NA	4,4100	0,4631	< 0,6908	NA
M7	ND	NA	ND	NA	1,5200	0,1693
M8	1,8500	0,2722	1,3694	0,1723	ND	NA
M9	ND	NA	ND	NA	ND	NA
M10	ND	NA	ND	NA	ND	NA
M11	1,0700	0,1333	0,7600	0,0916	ND	NA
M12	0,7100	0,0706	ND	NA	0,8700	0,0853
M13	1,1600	0,1486	1,3600	0,1714	0,9900	0,0929
M14	0,8100	0,0854	0,9200	0,0988	0,7800	0,1105
M15	0,9100	0,0975	0,9100	0,1036	0,9600	0,1105
M16	< 0,6908	NA	< 0,6908	NA	0,9700	0,1105
M17	ND	NA	0,9800	0,1119	ND	NA
M18	ND	NA	ND	NA	ND	NA
M19	ND	NA	< 0,6908	NA	ND	NA
M20	< 0,6908	NA	< 0,6908	NA	ND	NA
M21	< 0,6908	NA	ND	NA	< 0,6908	NA
M22	1,2800	0,1510	18,3800	2,0792	1,2200	0,1427
M23	8,8900	1,1024	3,4600	0,4811	ND	NA
M24	51,0400	6,7540	2,2000	0,2953	2,4036	0,3363
M25	2,5400	0,3822	11,6500	1,7493	3,0900	0,4902
M26	ND	NA	ND	NA	ND	NA
M27	1,7100	0,2330	< 0,6908	NA	ND	NA

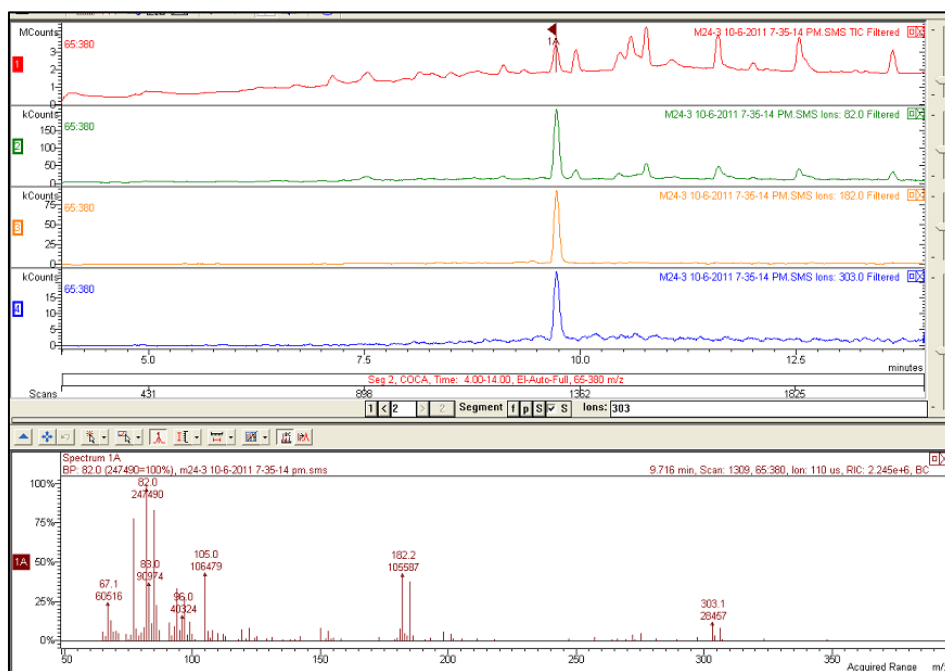
<sup>a</sup> ND: No Detectado<sup>b</sup> NA: No Aplica

En la **Tabla 4-12** se presentan los resultados cuantitativos del análisis de las muestras, expresados como ng de cocaína / mg de cabello, con sus respectivas incertidumbres. Las casillas que contienen las letras “ND”, se refiere a muestras donde no se detectó el analito de interés. Los valores menores a 0.69 ng/mg, se reportan de esta forma por encontrarse entre el límite de detección y cuantificación, es decir que, se detectó la

molécula, pero no se tiene certeza de la cantidad de cocaína que se encuentra en el cabello, puesto que no están dentro del rango de linealidad del método. Los demás resultados, se consideran positivos y cuantificables, puesto que, son valores mayores al punto de corte establecido por SAMHSA y SOHT (0,50 ng/mg) y, están dentro del rango de linealidad del método, en el cual se garantiza la exactitud y la precisión de la medida.

Los autores de un estudio llevado a cabo en Croacia en el año 2001 (Skender, Karacic, Brcic, & Bagaric, 2002), en donde implementan una metodología analítica utilizando cromatografía de gases-masas para cuantificar drogas ilícitas como anfetaminas, cocaína y opiáceos, evalúan el posible consumo de cocaína, cuantificando solamente la molécula padre, es decir, no metabolitos y, aunque trabajaron solamente las muestras de 36 sujetos sospechosos de usar drogas, concluyen que su investigación contribuye al conocimiento de la tendencia de abuso de drogas en jóvenes de 16 a 22 años de edad.

**Figura 4-5:** Cromatograma y espectro de masas de cocaína detectada en M24 segmento distal (1. TIC, 2. Ión 82, 3. Ión 182, 4. Ión 303)



La Figura 4-5 es un ejemplo de la identificación de cocaína en el tercer segmento (distal) de la muestra 24 (M24), cuya cantidad encontrada fue de 2.40 ng/mg de cabello; se

muestra el cromatograma total, los iones característicos de la molécula filtrados y el espectro de masas correspondiente.

De acuerdo con los resultados cuantitativos, una persona (4%) tuvo un consumo muy severo de cocaína, otra (4%) presentó consumo moderado y catorce de las participantes (52%), consumo leve, durante los tres meses anteriores a la toma de muestra (febrero, marzo y abril de 2011).

En los meses de noviembre y diciembre de 2010 y enero de 2011 (segundo trimestre evaluado), consumieron la droga en estudio de manera leve el 52% de las voluntarias (14 niñas), moderada un 7% (2 niñas) y severa también un 7% de la población en estudio.

En el período más lejano evaluado, meses de agosto, septiembre y octubre de 2010, consumieron cocaína de forma leve doce de los individuos (44%) y, de forma moderada una sola persona (4%).

Los resultados “ND” (no detectado) se consideran negativos pero deben evaluarse con precaución, puesto que puede ocurrir que la cantidad de droga consumida no haya sido la suficiente, o durante el período de tiempo necesario para que la droga se incorpore al pelo en la cantidad necesaria para ser detectada, aunque son útiles para confirmar la versión dada por persona acerca de no consumo de la droga. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la información obtenida a través de la breve entrevista, está limitada a lo que recuerda y quiere contar cada individuo, por tanto, puede ser inexacta, incompleta e irreal.

Por lo anterior, se compararon los resultados cuantitativos con la información manifestada por cada participante antes de tomar la muestra de cabello, con el fin de confirmar su testimonio. En la entrevista, el 63% de las personas manifestaron haber consumido cocaína (como bazuco, perico o maduro) en algún momento durante el período evaluado en el cabello (de agosto de 2010 a abril de 2011), sin embargo, se detectó cocaína en el 85% de las muestras y, de éstas, el 78% se consideraron positivas. De esta manera, se deduce que algunas de las jóvenes no admitieron ser consumidoras aunque los resultados del análisis en cabello demuestra lo contrario; esta situación se confirmó al observar que de las 10 participantes que manifestaron no haber consumido

cocaína, la droga se detectó en 9 de ellas. Por otro lado, a tres personas no se les detectó cocaína en los 9 cm de cabello analizado, pero comentaron haberla consumido, lo cual podría deberse la inexactitud en las fechas de consumo manifestadas.

A continuación se describen los resultados comparativos entre los cualitativos (mediante la entrevista realizada antes de tomar la muestra de cabello) frente a los cuantitativos obtenidos para cada muestra, estableciendo la historia de consumo de cada participante.

Muestra 1. Participante de 14 años de edad: manifiesta haber consumido cocaína (bazuco) durante un año y, por última vez en julio de 2010, y mostró una cantidad de la droga  $< 0,69$  ng / mg de cabello en el tercer segmento, es decir, que ésta ya casi se elimina por completo.

Muestra 2. Participante de 15 años de edad: se encontraron trazas de cocaína en el primer segmento lo cual corrobora su testimonio de último consumo hace un mes, mientras que no hay rastros de la droga en segundo ni en el tercer segmento, es decir, que había transcurrido el tiempo suficiente para eliminar, aquella consumida (bazuco) durante un año cuando tenía 14 años, tal vez solamente lo hizo ocasionalmente.

Muestra 3. Participante de 16 años de edad: comenta que consumió cocaína (perico) continuamente desde los 13 años hasta junio de 2010 (aproximadamente dos años) y presentó resultados positivos en el segundo y tercer segmento evidenciando dicho consumo; en este tiempo seguramente se estaba eliminando la droga, teniendo en cuenta la tasa de eliminación de 1,5 meses a través del cabello, además, en el primer segmento ya no se detectó.

Muestra 4. Participante de 12 años de edad: entre las sustancias que dice haber consumido están inhalantes (pegante), cigarrillo y marihuana, pero presenta trazas de cocaína en el segundo segmento y positivo en el primer segmento, lo cual muestra que hubo un consumo de cocaína en los últimos seis meses.

Muestra 5. Participante de 17 años de edad: cuenta que consumió cocaína (bazuco) durante seis meses hasta octubre de 2010 y presenta análisis positivo en el segundo

segmento de cabello, confirmando así un consumo posiblemente intermitente de la droga.

Muestra 6. Participante de 18 años de edad: manifiesta haber consumido inhalantes (pegante), marihuana, cigarrillo y alcohol, aunque claramente se evidencia el consumo de cocaína, cuyo análisis es positivo en el segundo segmento y de trazas en el tercero.

Muestra 7. Participante de 18 años de edad: revela haber consumido cocaína como perico algunas veces unos tres años atrás y como bazuco durante un mes en junio de 2010, y efectivamente se evidencia un consumo positivo en el tercer segmento de su cabello, muy posiblemente mientras lo estaba eliminando, dado que en el primer y segundo segmento ya no hay presencia de cocaína.

Muestra 8. Participante de 17 años de edad: cuenta que consumió cocaína (bazuco) desde hace dos años y por última vez en abril de 2010, aunque al parecer lo hizo en los últimos 9 meses porque tuvo resultados analíticos positivos en el primer y segundo segmento de cabello, teniendo en cuenta que la medida de éstos fue de 4,5 cm cada uno, debido a que la muestra se agotó, al ser utilizada en la etapa de estandarización de la metodología analítica.

Muestra 9. Participante de 15 años de edad: manifiesta consumir cocaína (perico) desde los 14 años y por última vez un mes y medio antes de la toma de muestra, pero los análisis en cabello no detectan consumo en los últimos 9 meses, tiempo en el cual pudo haber un consumo mínimo o la sustancia consumida pudo ser diferente a la droga en estudio.

Muestra 10. Participante de 15 años de edad: dice haber consumido cigarrillo y alcohol solamente, por tanto, sus resultados analíticos son concordantes, dado que no se detectó cocaína en ninguno de los segmentos estudiados.

Muestra 11. Participante de 17 años de edad: revela haber sido consumidora de cocaína, tanto de bazuco durante cuatro meses como de perico durante dos años, éste último lo consumió por última vez en agosto de 2010 (ocho meses antes de la toma de muestra); pero el análisis de su cabello por segmentos, muestra que sí hubo consumo en los seis

meses anteriores a la toma de muestra, ya que resultaron positivos el primer y segundo segmento.

Muestra 12. Participante de 15 años de edad: cuenta que consumió cocaína en el 2010, como bazuco unas pocas veces y como perico durante unos 3 a 4 meses, éste en septiembre de 2010 por última vez, es decir durante el tercer trimestre evaluado (tercer segmento) donde el análisis fue positivo para cocaína, al igual que el primer segmento, mostrando así un consumo intermitente de la droga.

Muestra 13. Participante de 16 años de edad: narra que consumió cocaína en forma de perico y de bazuco. El primero durante dos años y en diciembre de 2010 por última vez, mientras que el segundo durante un año y por última vez en febrero de 2011. Efectivamente los resultados analíticos fueron positivos para los últimos 9 meses.

Muestra 14. Participante de 17 años de edad: dice que consumió cocaína, pocas veces como perico a finales de noviembre de 2010 y, bazuco durante un año, siendo su última vez cinco meses antes de la toma de muestra, aunque el análisis de cabello revela que hubo consumo constante durante los últimos 9 meses.

Muestra 15. Participante de 15 años de edad: cuenta que ha consumido cocaína, ocasionalmente bazuco (unas seis veces) desde junio de 2010 hasta febrero de 2011, y perico de febrero a julio de 2010. Este consumo constante se confirma con los resultados positivos en los tres segmentos de cabello.

Muestra 16. Participante de 14 años de edad: entre las sustancias que manifiesta haber consumido, cigarrillo, alcohol e inhalado cloruro de metileno (dick), aunque los resultados analíticos son positivo en el tercer segmento, y de traza en los otros dos segmentos.

Muestra 17. Participante de 13 años de edad: dice que las únicas drogas que ha consumido son marihuana y alcohol; esperando obtener resultados negativos en los 9 cm de cabello analizado, se obtuvo un positivo en el segundo segmento, es decir que hubo consumo de unos 4 a 6 meses antes de la toma de muestra.



Muestra 18. Participante de 18 años de edad: manifiesta que consumió cocaína en forma de perico durante año y medio hasta diciembre de 2010, y en forma de bazuco por 4 meses siendo la última vez aproximadamente 5 meses antes de tomar la muestra, pero los análisis no detectan consumo de la droga en los últimos 9 meses.

Muestra 19. Participante de 16 años de edad: cuenta haber consumido cocaína, primero perico por dos meses, siendo la última vez en mayo de 2010 y, después bazuco durante una semana, siendo la última vez en diciembre de 2010, mes que cae en el segundo segmento de análisis donde se detectaron trazas de la droga.

Muestra 20. Participante de 14 años de edad: revela que ha consumido cocaína, tanto bazuco (durante un año) como perico (durante dos años), siendo la última vez en que consumió diciembre de 2010 y enero de 2011 respectivamente; por tanto es coherente haber encontrado trazas de la droga en los dos primeros segmentos.

Muestra 21. Participante de 16 años de edad: narra haber consumido cocaína (perico y bazuco) por unos cinco meses y la última vez en febrero de 2011; cuyos análisis de cabello muestran trazas de la droga en el primer y tercer segmento, es decir que hubo consumo entre uno y tres meses y, siete y nueve meses antes de la toma de muestra.

Muestra 22. Participante de 15 años de edad: cuenta que consumió cocaína (perico) por unos dos años, siendo la última vez que lo hizo, dos meses antes de tomarle la muestra de cabello, por tanto, los resultados analíticos efectivamente corroboran el consumo crónico, dando positivo en toda la extensión de cabello analizada, siendo el segundo segmento el que mostró mayor concentración del analito, que podría significar un alto consumo durante esta época.

Muestra 23. Participante de 15 años de edad: dice haber consumido cocaína (perico) durante seis meses y la última vez en noviembre de 2010, además, una mezcla conocida como “maduro” que contiene cocaína y marihuana, durante un mes y la última vez también en noviembre de 2010. Los análisis muestran resultados positivos para la droga en los dos primeros segmentos, es decir, en los seis meses anteriores a la toma de muestra, mientras que en el tercer segmento no se detectó cocaína, al parecer en ese tiempo no hubo consumo.

Muestra 24. Participante de 14 años de edad: manifiesta que consumió cocaína (perico) desde los 12 años y la última vez que lo hizo fue dos meses y medio antes de tomarle la muestra; se esperaba encontrar altas concentraciones de cocaína en el cabello, cuyos análisis fueron positivos en toda la extensión (9 cm), siendo el primer segmento el de mayor concentración, revelando el alto consumo de la droga en los tres meses antes de la toma de muestra.

Muestra 25. Participante de 18 años de edad: de acuerdo con la entrevista no ha consumido cocaína, pero los análisis en cabello muestran que sí hubo consumo de la misma, por lo menos en los nueve meses anteriores a la toma de muestra.

Muestra 26. Participante de 15 años de edad: cuenta que consumió cocaína (perico) una sola vez en diciembre de 2010, que no pudo ser detectada en los análisis de cabello, puesto que en ningún segmento se detectó el analito.

Muestra 27. Participante de 15 años de edad: dice haber consumido cocaína (bazuco) una sola vez en diciembre de 2010; pero los resultados de los análisis de cabello revelan un consumo mayor, puesto que fue positivo en el primer segmento y se detectaron trazas en el segundo segmento, es decir, hubo consumo en el transcurso de los 6 meses antes de la toma de muestra.

## 5. Limitaciones del estudio

La parte experimental de esta tesis fue planteada desde un principio para desarrollar en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y, utilizando específicamente el Equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas Varian 450-220, con la intención de validar e implementar una metodología analítica que contribuiría con el proceso de Acreditación del Laboratorio.

En este sentido, la mayor limitación de este estudio se encontró en el Equipo GC-MS, puesto que no estuvo en óptimas condiciones de manera constante durante el tiempo de trabajo de laboratorio, presentando problemas como: daño en la tarjeta principal del cromatógrafo de gases, falla en el electromultiplicador y baja sensibilidad.

Por tanto, el tiempo efectivo de obtención de datos cromatográficos (validación de la metodología analítica y corrida de 81 muestras) fue corto, aproximadamente de dos meses, limitando la realización de mayor cantidad de ensayos para el análisis de benzoilecgonina y otros metabolitos de la cocaína.

De la principal limitación descrita, se deriva otra, referente a la no identificación de los metabolitos de la cocaína. Se inician los ensayos para analizar el principal metabolito de la cocaína, la Benzoilecgonina, el cual es el más comúnmente reportado en la literatura y el más abundante. Esta molécula además presenta propiedades que dificultan su análisis mediante GC-MS; entre ellas: es lábil a altas temperaturas, requiere de un paso adicional antes de inyectar en el cromatógrafo.

Es así como debe formarse un derivado con un agente adecuado para darle mayor estabilidad a la molécula de benzoilecgonina, para que resista las condiciones de la cromatografía de gases.

Se utilizó el derivatizante BSTFA+TMCS 1%, siendo éste uno de los agentes derivatizantes mayor reportados en la literatura y recomendados para este tipo de compuestos. Las condiciones sugeridas por el fabricante incluyen: adicionar 0,5 mL del agente derivatizante a 1-10 mg de muestra, si es necesario, adicionar algún solvente (normalmente piridina o dimetilformamida), calentar de 60 a 80 °C por 20 min para incrementar la velocidad de la reacción (MACHEREY - NAGEL GmbH & Co, 2011).

Además, en algunos de los procedimientos investigados, nombran una evaporación de la muestra derivatizada bajo atmósfera de nitrógeno, no disponible en el laboratorio, por tanto, no realizada. La corriente de nitrógeno reduce la presión parcial directamente sobre el líquido para acelerar la evaporación. Este paso se realizaría con el fin de eliminar el oxígeno

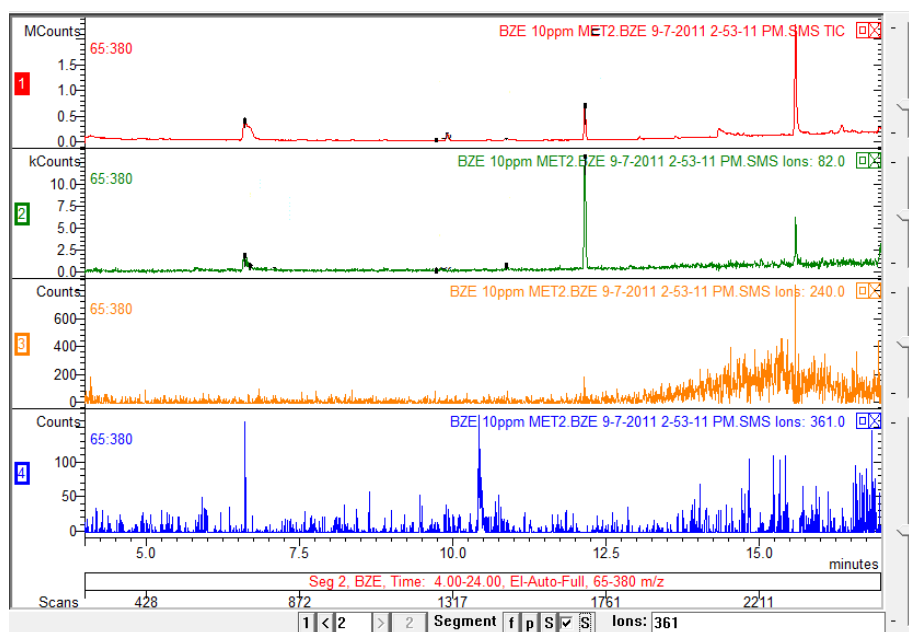
Los diferentes procedimientos de derivatización ensayados, se describen en la Tabla 5-1. Ninguno de ellos arrojó resultados en el GC-MS, como se muestra en la

**Figura 5-1**, por tanto no fue posible continuar la investigación con este metabolito.

**Tabla 5-1:** Procedimientos de derivatización ensayados

Volumen adicionado (µL)	Solvente adicionado	Temperatura de reacción (°C)	Tiempo de reacción (min)	Fuente
50	Ninguno	80	30	(Riveros Toledo & Martínez Ramírez, 2008)
50	Piridina	80	30	Experimental
40	Ninguno	100	20	(Míguez-Framil, Moreda-Piñeiro, Bermejo-Barrera, Cocho, Tabernero, & Bermejo, 2011)
40	Piridina	100	20	Experimental
50	Ninguno	70	30	(Romano, Barbera, & Lombardo, 2001)
50	Piridina	70	30	Experimental

**Figura 5-1:** Cromatograma benzoilecgonina derivatizada sin identificar, e iones característicos 82, 240 y 361





## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

Se optimizó una metodología analítica para la determinación de cocaína usando como matriz biológica el cabello, la cual incluye toma de muestra, selección de muestras aptas para el análisis, tratamiento de la muestra (lavado, digestión, extracción y purificación de analitos) y, condiciones cromatográficas para analizar los extractos y definir si está presente y en qué cantidad, el analito de interés.

Conociendo que los principales metabolitos de la cocaína son benzoilecgonina y ecgonina metil éster (Lizasoain, Moro, & Lorenzo, 2002), se eligió el primero como analito de trabajo por encontrarse en mayor número de estudios científicos. Esta molécula se degrada a altas temperaturas, por lo que es necesario formar un derivado para poder detectarla mediante cromatografía de gases; este proceso químico implica mayor complejidad y control, además de requerir mayor tiempo de trabajo no disponible en el laboratorio, lo cual dificultó su valoración, por consiguiente, no se consiguieron resultados en el laboratorio a pesar de la variedad de ensayos realizados y, se decidió trabajar únicamente con el analito principal que es la cocaína.

Se validó la metodología analítica optimizada. Dicha metodología resultó selectiva, precisa, exacta, lineal en el rango de concentraciones de 0.46 a 40.00  $\mu\text{g/mL}$  (0.69 a 60 ng/mg de cabello), con un límite de detección de 0.1203  $\mu\text{g/mL}$  (0.1925 ng/mg de cabello) y un límite de cuantificación de 0.4605  $\mu\text{g/mL}$  (0.6908 ng/mg de cabello), una recuperación del 98% y, una estabilidad de las muestras en el automuestreador de máximo seis (6) horas.

Se aplicó la metodología analítica validada en una población de individuos consumidores, mediante el estudio de segmentos de cabello, para conocer el posible historial de uso de

cocaína. En general, el 15% de las jóvenes no consumieron cocaína durante el período de nueve meses evaluado (de agosto de 2010 a abril de 2011), mientras que el 85% restante consumió esta droga ilícita en algún momento en el tiempo nombrado; de este último porcentaje correspondiente a los consumidores, el 70% usó cocaína durante el trimestre inmediatamente anterior a la toma de la muestra, el 78% en el segundo trimestre (segmento intermedio), el 57% en el tercer trimestre representado en el segmento distal y, el 30% en el total del tiempo valorado, es decir, la droga estuvo presente en las tres divisiones del cabello.

El proyecto de tesis realizado, reafirma la posibilidad de un análisis cronológico de consumo de drogas de abuso como la cocaína, utilizando la matriz biológica cabello, de manera que amplía la investigación de casos que pueden verse limitados con los análisis toxicológicos comunes en matrices como orina y sangre.

## **6.2 Recomendaciones**

Utilizar la metodología analítica planteada en este documento para trabajar con los metabolitos de la cocaína, adicionando un paso de derivatización antes del análisis cromatográfico.

Podrían modificarse las condiciones del equipo para obtener mayor sensibilidad, como una opción de MS/MS, dadas las bajas concentraciones en que se esperaría encontrar los metabolitos de la cocaína.

Probar diferentes agentes derivatizantes que permitan obtener resultados favorables en la detección y cuantificación de los metabolitos de la cocaína, mediante GC-MS.

Esta investigación puede extenderse a la búsqueda de otras drogas de abuso y sus metabolitos en cabello, tales como, cannabinoides, anfetaminas, opiáceos, benzodiacepinas, entre otras.



## Bibliografía

- Baumgartner, A., Jones, P., Baumgartner, W., & Black, C. (1979). Radlloimmunoassay of Hair for Determining Opiate-Abuse Histories. *The Journal of Nuclear Medicine*(20), 748-752.
- Bejarano, M. A., & Ruiz, A. (2011). *Estandarización del tratamiento de cabello como matriz para la determinación de cocaína y metabolitos*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Bejarano, M. A., & Ruiz, A. (2011). *Optimización del Tratamiento de Cabello como Matriz Biológica para la Determinación de Cocaína*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Cognard, E., Rudaz, S., Bouchonnet, S., & Staub, C. (2005). Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. *Journal of Chromatography B*(826), 17-25.
- Cordero, R., & Paterson, S. (2007). Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC–MS. *Journal of Chromatography B*, 850, 423-431.
- Delaney-Black, V., Chiodo, L., Hannigan, J., Greenwald, M., Janisse, J., Patterson, G., y otros. (2011). Prenatal and postnatal cocaine exposure predict teen cocaine use. *Neurotoxicology and Teratology*(33), 110-119.
- Duckworth Warner, T., Behnke, M., Davis Eyler, F., & Szabo, N. (2011). Early adolescent cocaine use as determined by hair analysis in a prenatal cocaine exposure cohort. *Neurotoxicology and Teratology*(33), 88-99.

- Felli, M., Martello, S., Marsili, R., & Chiarotti, M. (2005). Disappearance of cocaine from human hair after abstinence. *Forensic Science International*(154), 96-98.
- Flanagan, R. J., Taylor, A., Watson, I. D., & Whelpton, R. (2007). *Fundamentals of Analytical Toxicology*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Garcia-Bournissen, F., Moller, M., Nesterenko, M., Karaskov, T., & Koren, G. (2009). Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use. *Forensic Science International*(189), 24-27.
- Gobierno Nacional de la República de Colombia. (2011). *Estudio Nacional de Consumo de Sustancias Psicoactivas en Población Escolar Colombia - 2011*.
- Harris, D. S., Everhart, E. T., Mendelson, J., & Jones, R. T. (2003). The pharmacology of cocaethylene in humans following cocaine and ethanol administration. *Drug and Alcohol Dependence*(72), 169-182.
- Hill, V., Cairns, T., & Schaffer, M. (2008). Hair analysis for cocaine: Factors in laboratory contamination studies and their relevance to proficiency sample preparation and hair testing practices. *Forensic Science International*(176), 23-33.
- Janicka, M., Kot-Wasik, A., & Namiesnik, J. (2010). Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(3), 209-224.
- Johnston, L., O'Malley, P., Bachman, J., & Schulenberg, J. (2011). *Monitoring the Future. National Results on Adolescent Drug Use*. Michigan: National Institute on Drug Abuse.
- Joya, X., Fríguls, B., Simó, M., Civit, E., de la Torre, R., Palomeque, A., y otros. (2011). Acute heroin intoxication in a baby chronically exposed to cocaine and heroin: a case report. *JOURNAL OF MEDICAL CASE REPORTS*, 5(288), 1-3.

- Jurado, C., Giménez, M., Menéndez, M., & Repetto, M. (1995). Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Science International*(70), 164-174.
- Kintz, P. (1998). Hair testing and doping control in sport. *Toxicology Letters*(102-103), 109-113.
- Kintz, P. (2004). Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Science International*(142), 127-134.
- Kintz, P. (2007). *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. (P. Kintz, Ed.) United States of America: Taylor & Francis Group.
- Klein, J., Karaskov, T., & Koren, G. (2000). Clinical applications of hair testing for drugs of abuse — the Canadian experience. *Forensic Science International*(107), 281-288.
- Kronstrand, R., Nyström, I., Forsman, M., & Käll, K. (2010). Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Science International*(196), 55-58.
- Lachenmeier, K., Musshoff, F., & Madea, B. (2006). Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. *Forensic Science International*, 159, 189-199.
- Lizasoain, I., Moro, M., & Lorenzo, P. (2002). Cocaína: aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 14(1), 57-64.
- MACHEREY - NAGEL GmbH & Co. (2011). *MACHEREY - NAGEL*. Recuperado el 15 de marzo de 2011, de <http://www.mn-net.com/tabid/10221/default.aspx>
- MICROMEDEX 2.0. (22 de febrero de 2012). *MICROMEDEX 2.0*. Recuperado el 21 de marzo de 2012, de

[http://www.thomsonhc.com/micromedex2/librarian/ND\\_T/evidencexpert/ND\\_PR/evidencexpert/CS/F16D80/ND\\_AppProduct/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/339BF7/ND\\_PG/evidencexpert/ND\\_B/evidencexpert/ND\\_P/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?](http://www.thomsonhc.com/micromedex2/librarian/ND_T/evidencexpert/ND_PR/evidencexpert/CS/F16D80/ND_AppProduct/evidencexpert/DUPLICATIONSHIELDSYNC/339BF7/ND_PG/evidencexpert/ND_B/evidencexpert/ND_P/evidencexpert/PFActionId/evidencexpert.DoIntegratedSearch?)

Míguez-Framil, M., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., Cocho, J. Á., Tabernero, M. J., & Bermejo, A. M. (2011). Electrospray ionization tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of opiates and cocaine in human hair. *Analytica Chimica Acta*(704), 123-132.

Museo Nacional de Ciencias Naturales. (s.f.). *Museo Nacional de Ciencias Naturales*. Recuperado el 27 de septiembre de 2012, de mncn: [http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es\\_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria\\_de\\_masas.pdf](http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf)

National Institute of Drug Abuse. (marzo de 2010). *Cocaína: Abuso y Adicción*. Estados Unidos: NIDA.

National Institute of Drug Abuse, NIDA. (septiembre de 2009). *La Cocaína*. Estados Unidos: NIDA.

NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO/IEC 17025. (2005). *Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración*. ICONTEC.

Perkins de Piacentino, A. M., Locani, O., & Lorenzo, J. (Año 3). DROGAS EN PELO: SUS ALCANCES Y LIMITACIONES. I. *CUADERNOS DE MEDICINA FORENSE*(1), 31-41.

Pragst, F., & Balikova, M. (2006). State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clinica Chimica Acta*(370), 17-49.

Quintela, O., Bermejo, A., Tabernero, M., Strano-Rossi, S., Chiarotti, M., & Lucas, A. (2000). Evaluation of cocaine, amphetamines and cannabis use in university

- students through hair analysis: preliminary results. *Forensic Science International*(107), 273-279.
- Ricossa, M. C., Bernini, M., & De Ferrari, F. (2000). Hair analysis for driving licence in cocaine and heroin users. An epidemiological study. *Forensic Science International*(107), 301-308.
- Riveros Toledo, I., & Martínez Ramírez, J. (2008). Validación de un método de análisis de cocaína, opiáceos y cannabinoides mediante el análisis de pelo por GC/MSD para determinar consumo crónico. *Revista Científica Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*, 20(3), 35-47.
- Romano, G., Barbera, N., & Lombardo, I. (2001). Hair testing for drugs of abuse: evaluation of external cocaine contamination and risk of false positives. *Forensic Science International*(123), 119-129.
- Sánchez Pérez, S. (Enero de 2008). Resultados de los análisis de drogas de abuso en pelo en la Comunidad Autónoma de Aragón. *Revista de la Escuela de Medicina Legal*, 4-13.
- Scott, K. (2009). The use of hair as a toxicological tool in DFC casework. *Science and Justice*(49), 250-253.
- Scott, K., & Hoy, K. (2005). Monitoring drug use through segmental hair analysis. A three year case study. *Journal of Analytical Toxicology*, 29(5), 477.
- Scott, R. (2003). *Book 2: Gas Chromatography*. Chrom-Ed Book Series.
- Skender, L., Karacic, V., Brcic, I., & Bagaric, A. (2002). Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Forensic Science International*(125), 120-126.
- Society of Hair Testing. (1997). Society of Hair Testing. *Forensic Science International*, 84, 3-6.

Society of Hair Testing. (2004). Recommendations for hair testing in forensic cases.

*Forensic Science International*(145), 83-84.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration. (2011). *Results from the 2010 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings, NSDUH*.

Tassiopoulos, K., Bernstein, J., Heeren, T., Levenson, S., Hingson, R., & Bernstein, E. (2004). Hair testing and self-report of cocaine use by heroin users. *Society for the Study of Addiction*(99), 590-597.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). (May 2001). *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. (July 1999). *Guidance for Industry - VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: DEFINITION AND TERMINOLOGY*.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Veterinary Medicine. (July 1999). *Guidance for Industry - VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: METHODOLOGY*.

United Nations Office on Drugs and Crime. (2012). *World Drug Report*. New York: United Nations Office on Drugs and Crime.

Vignali, C., Stramesi, C., Vecchio, M., & Groppi, A. (2012). Hair testing and self-report of cocaine use. *Forensic Science International*(215), 77-80.

## A. Anexo: Aprobación de la Comunidad Terapéutica



Centro Industrial Agropecuario San Gregorio  
"Comunidad Terapéutica Amigoniense San Gregorio"

PGATI - 128

COTA, CUNDINAMARCA, MAYO 04 DE 2011

DR. JAIRO ALFONSO TELLEZ MOSQUERA  
Coordinador Académico  
Programa Curricular Maestría en Toxicología  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
BOGOTÁ

REF: RESPUESTA SOLICITUD DE REALIZACIÓN PROYECTO

Reciba un cordial saludo, de paz y bien;

Por medio de la presente enviamos a usted respuesta a su solicitud de realizar el proyecto titulado "DETERMINACION DE COCAÍNA Y SUS METABOLITOS EN CABELLO COMO BIOMARCADOR DE CONSUMO CRÓNICO, MEDIANTE GC-MS/MS". Frente a lo cual y según lo acordado con el Dr. William Quevedo aprobamos su solicitud, ya que consideramos pertinente para nuestra institución, frente a los datos que se esperan obtener.

Por lo anterior, nos permitimos solicitar a usted y a los responsables de la investigación el mantener y resguardar la identidad de los niños, niñas y adolescentes; entendiendo el derecho a la confidencialidad de las historias de los menores; de igual forma presentar el proyecto correspondiente con el fin de acordar y organizar los espacios requeridos para el desarrollo del estudio; una vez culmine el proceso de investigación hacer la respectiva presentación, aportar a la institución el informe escrito de los resultados y el Resumen analítico investigativo del cual anexamos un formato.

Agradecemos el contar con nuestra institución y en espera de que este importante trabajo nos aporte mutuamente para la atención terapéutica integral del los niños, niñas y adolescentes

Atentamente,

  
PADRE JACINTO GUARÍN C.  
Director

  
NATALIA MONROY G.  
Coord. General Terapéutica



Religiosos Terciarios Capuchinos  
Sede Cota: Dirección Km. 2 Vía Siberia - Cota Tel.: 877 6458 - 876 7353 Cel: 3115134247  
E Mail sangregoriocota@etb.net.co  
Sede Bogotá: Cra. 16 A No. 48 - 84 Tel: 232 6771 - 323 2175 Cel: 3138158411  
E-Mail sangregoriosco@yahoo.es

## B. Anexo: Consentimiento Informado

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA – DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
MAESTRÍA EN TOXICOLOGÍA

### CONSENTIMIENTO INFORMADO DE PARTICIPACION EN EL ESTUDIO

Yo \_\_\_\_\_, he sido informado(a) que la Maestría en Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia, va a llevar a cabo el proyecto de investigación en determinación de cocaína y sus metabolitos en cabello como biomarcador de consumo crónico en personas farmacodependientes.

Yo he elegido participar libremente en el estudio, entiendo que esto significa responder una entrevista para la historia clínica en la cual se exploran algunos aspectos de mi vida, en especial relacionados con mis antecedentes de consumo de drogas y, una toma de muestra de cabello.

Entiendo que dentro del estudio no se me realizará ningún tipo de seguimiento familiar, laboral o judicial y dado que mi participación es enteramente voluntaria puedo rehusarme a contestar cualquier pregunta o retirarme voluntariamente en cualquier momento del estudio sin que esto acarree algún tipo de consecuencia.

Entiendo que participar en el estudio no conlleva riesgo alguno, que la información y muestra obtenidas de mí serán tratadas de forma confidencial y que no voy a ser identificado personalmente en los resultados del estudio, que no obtendré remuneración económica y el beneficio se recibirá por medio del conocimiento generado en el presente estudio. Sin embargo, si al participar se me encuentra alguna condición que requiera tratamiento se me ofrecerá orientación médica al respecto.

Se me ha preguntado si tengo alguna duda acerca del estudio en este momento y si tuviese en el futuro alguna duda del mismo puedo obtener información en el Departamento de Toxicología, en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

---

FIRMA PARTICIPANTE

---

FIRMA TUTOR LEGAL

---

FIRMA DIRECTOR DE LA INVESTIGACION



## C. Anexo: Formato de Toma de Muestra

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE MEDICINA – DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA  
MAESTRIA EN TOXICOLOGIA

### FORMATO DE TOMA DE MUESTRA DE CABELLO PARA ANALISIS DE COCAINA Y SUS METABOLITOS

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_ No. Historia Clínica: \_\_\_\_  
Día Mes Año

Nombre completo del paciente: \_\_\_\_\_

Documento de identidad: \_\_\_\_\_

Sustancia de Abuso Consumida	Tiempo de consumo	Fecha del último consumo

Medicamentos en uso: \_\_\_\_\_

#### Paciente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Documento de identidad

#### Acudiente

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Documento de identidad

#### Médico que realiza asesoría

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Documento de identidad

#### Muestra tomada por

\_\_\_\_\_  
Firma

\_\_\_\_\_  
Documento de identidad

## D. Anexo: Aprobación del Comité de Ética



CE - 025

Bogotá, 10 de marzo de 2011

Doctor  
**JAIRO ALFONSO TÉLLEZ**  
Coordinador  
Maestría en Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad nacional de Colombia

Respetado doctor Téllez:

Le comunico que el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, en reunión realizada el 10 de marzo de 2011 (Acta N°. 04), expuso la evaluación del proyecto de investigación titulado: **"DETERMINACIÓN DE COCAINA Y SUS METABOLITOS EN CABELLO COMO BIOMARCADOR DE CONSUMO CRÓNICO, MEDIANTE GC-MS/MS"**, presentado por la estudiante de maestría en toxicología Marian Dalila Vallejo.

Luego de una cuidadosa revisión el Comité considera que el proyecto cumple con los requisitos mínimos de carácter ético, por lo cual emite **Concepto Aprobatorio**.

Cordialmente,

  
**OSCAR GARCÍA VEGA**  
Presidente  
Comité de Ética  
Facultad de Medicina

cc: Archivo



90199

ciencia tecnología e innovación para el país  
Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA- Piso 4ª Oficina 431  
Teléfono (3165000 Ext. 15167)  
Correo electrónico: goprd\_fm@una.edu.co  
Bogotá Colombia, Sur América

## E. Anexo: Certificado de Pasantía Internacional



### Informe de Pasantías y Capacitaciones campo clínico

Santiago de Chile, 21 de Diciembre 2011

**Doctora**  
**Nancy Patiño Reyes**  
**Docente Departamento de Toxicología**  
**Directora de Tesis- Marian Dalila Vallejo**

Es grato para nuestro laboratorio SERVITOX, especializado en el área de Toxicología y campo clínico del Departamento de Medicina legal de la Universidad de Chile y de la Universidad Mayor; informa de la evaluación de la pasantía de la Estudiante de Maestría Marian Dalila Vallejo Huerta.

De acuerdo a esta evaluación que se adjunta, se han considerado los distintos aspectos de la estudiante cuyo objetivo fue familiarizarse y adquirir destrezas en las metodologías analíticas de drogas de abuso en matriz cabellos, específicamente métodos cromatográfico y validación de estos.

La Srta. Marian Dalila Vallejo Huertas, C.C. No. 52.985.118 de Bogotá, Colombia, Química Farmacéutica de la Universidad Nacional de Colombia, Estudiante de Maestría en Toxicología (último año) con Tesis en Determinación de cocaína y metabolitos en cabello, mediante GC-MS

Esta profesional efectuó su pasantía en SERVITOX, entre los días 02 de Noviembre del año 2011 al 05 de diciembre 2011 y posteriormente en visita a distintas instituciones públicas y privadas relacionadas con área de adicciones, hasta el día 16 de diciembre 2011

#### Evaluación general

calificación	puntaje	Conocimiento teórico (saber)	Habilidades practicas (saber hacer)	Actitudinal (saber ser)
Insuficiente	1			
Suficiente	2			
Bueno	3			
Muy bueno	4	4	4	
Excelente	5			5

Su pasantía ha sido evaluada de acuerdo con la tabla adjunta, siendo calificada como muy buena, destacando su integración en grupo y proactividad

Saluda Cordialmente.

Dra. Laura Borgel Aguilera  
Director Técnico  
SERVITOX LTDA



## F. Anexo: Datos para cálculo de parámetros de validación y contenido de cocaína en las muestras

**Cuadro 1:** Datos para el cálculo de repetibilidad en sistema y método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Relación de áreas	
		Sistema	Método
1	0,50	0,1907	0,1340
		0,1726	0,1504
		0,1512	0,1513
		0,1654	0,1190
		0,1778	0,1260
2	10,00	2,8836	2,6744
		2,9696	2,8391
		2,9059	2,9364
		2,8622	2,8547
		2,8145	2,7457
3	40,00	12,4528	13,0388
		12,3626	10,6437
		12,5750	12,3870
		12,4794	10,6248
		12,6400	11,1229

**Cuadro 2:** Datos para el cálculo de precisión intermedia en sistema y método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Relación de áreas					
		Sistema					
		Analista 1			Analista 2		
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,50	0,1835	0,1907	0,1665	0,1813	0,1769	0,1736
		0,1905	0,1726	0,1509	0,1911	0,1520	0,1681
		0,1712	0,1512	0,1736	0,1713	0,1658	0,1764
		0,1558	0,1654	0,1764	0,2026	0,1807	0,1872
		0,1828	0,1778	0,1815	0,1931	0,1815	0,1668
2	10,00	2,9376	2,8836	2,8740	2,9654	2,9051	2,8512
		2,8880	2,9696	2,9476	2,7363	2,8395	2,7321
		2,9032	2,9059	2,8746	2,8932	2,8830	2,8812
		2,8906	2,8622	3,0061	2,8833	2,7541	2,8561
		2,8643	2,8145	2,8931	2,9928	2,9383	2,9500
3	40,00	12,5613	12,4528	12,6183	12,3793	12,1733	12,4134
		12,6214	12,3626	12,6001	12,4788	11,8923	12,1400
		12,5150	12,5750	12,4881	12,4763	12,4708	10,9944
		12,5853	12,4794	12,3723	11,2267	12,3793	11,8522
		12,3416	12,6400	12,5763	10,6102	10,6623	11,6788
Nivel	Concentración (µg/mL)	Método					
		Analista 1			Analista 2		
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3
1	0,50	0,1457	0,1340	0,1562	0,1462	0,1554	0,1465
		0,1374	0,1504	0,1543	0,1380	0,1366	0,1612
		0,1590	0,1513	0,1299	0,1596	0,1494	0,1368
		0,1376	0,1190	0,1430	0,1615	0,1579	0,1401
		0,1412	0,1260	0,1365	0,1495	0,1669	0,1513
2	10,00	2,8750	2,6744	2,9003	2,7376	2,6442	2,8263
		2,7896	2,8391	2,7302	2,7880	2,8019	2,6887
		2,8102	2,7364	2,8540	2,9032	2,7039	2,8827
		2,7185	2,8547	2,6339	2,6906	2,6856	2,7474
		2,6794	2,7457	2,6241	2,8643	2,7403	2,6949
3	40,00	12,6256	13,0388	12,8396	12,1920	10,9491	10,9071
		12,5546	10,6437	10,9428	12,1661	11,6089	10,4308
		11,3892	12,3870	12,8002	11,5462	10,2202	11,3985
		12,2095	10,6248	13,2780	10,7010	12,4467	11,6720
		10,8396	11,1229	10,0881	11,7250	10,8294	12,2172

**Cuadro 3:** Datos para elaborar las curvas de calibración de sistema y método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Sistema		Método	
		Relación de áreas	Factor de respuesta	Relación de áreas	Factor de respuesta
1	0,50	0,1835	0,3670	0,1457	0,2913
	0,50	0,1905	0,3810	0,1674	0,3348
	0,50	0,1712	0,3423	0,1590	0,3180
	0,50	0,1558	0,3116	0,1376	0,2752
	0,50	0,1828	0,3656	0,1412	0,2823
2	1,00	0,4315	0,4315	0,3899	0,3899
	1,00	0,4288	0,4288	0,4336	0,4336
	1,00	0,4088	0,4088	0,3346	0,3346
	1,00	0,4246	0,4246	0,4496	0,4496
	1,00	0,4412	0,4412	0,3118	0,3118
3	10,00	2,9376	0,2938	2,8750	0,2875
	10,00	2,8880	0,2888	2,5896	0,2590
	10,00	2,9032	0,2903	2,8102	0,2810
	10,00	2,8906	0,2891	2,7185	0,2718
	10,00	2,8643	0,2864	2,6794	0,2679
4	20,00	6,0724	0,3036	6,2174	0,3109
	20,00	5,8882	0,2944	6,0820	0,3041
	20,00	5,9228	0,2961	5,6927	0,2846
	20,00	6,1291	0,3065	5,9299	0,2965
	20,00	6,0963	0,3048	6,0626	0,3031
5	30,00	8,9691	0,2990	9,8855	0,3295
	30,00	9,0179	0,3006	8,8855	0,2962
	30,00	8,9546	0,2985	8,9491	0,2983
	30,00	8,9762	0,2992	9,8294	0,3276
	30,00	9,0610	0,3020	9,6693	0,3223
6	40,00	12,5613	0,3140	12,6256	0,3156
	40,00	12,6214	0,3155	11,5546	0,2889
	40,00	12,5150	0,3129	11,3892	0,2847
	40,00	12,5853	0,3146	12,2095	0,3052
	40,00	12,3416	0,3085	11,8396	0,2960
Promedio			0,3307		0,3117
DE			0,0497		0,0436
CV			15,04		14,00

**Cuadro 4:** Datos para las curvas de concentraciones bajas en sistema y método

Nivel	Concentración (µg/mL)	Relación de áreas	
		Sistema	Método
1	0,10	0,082529	0,081326
	0,10	0,106478	0,117085
	0,10	0,141326	0,278147
	0,10	0,117085	0,122767
	0,10	0,148147	0,210709
	0,10	0,122767	0,168147
2	0,25	0,182898	0,112413
	0,25	0,208151	0,206263
	0,25	0,180901	0,180901
	0,25	0,203114	0,263267
	0,25	0,172438	0,067158
	0,25	0,229855	0,289018
3	0,50	0,212483	0,311987
	0,50	0,250898	0,250861
	0,50	0,229855	0,182294
	0,50	0,266630	0,276536
	0,50	0,257404	0,120086
	0,50	0,322552	0,157404



**Cuadro 5:** Datos para las curvas de desviaciones estándar frente a la concentración para el cálculo de los límites de detección y cuantificación

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Desviación estándar	
	Sistema	Método
0,10	0,023873	0,072054
0,25	0,021443	0,085506
0,50	0,037802	0,074647
0,50	0,013604	0,012589
1,00	0,011837	0,060103
10,00	0,026833	0,111544
20,00	0,108731	0,198254
30,00	0,043423	0,487605
40,00	0,109537	0,500812

**Cuadro 6:** Datos para calcular la incertidumbre debida a las pipetas automáticas y el balón volumétrico

Lecturas	Pipeta automática 10-100 $\mu\text{L}$		Pipeta automática 100-1000 $\mu\text{L}$		Balón volumétrico de 2.0 mL	
	Volumen Declarado ( $\mu\text{L}$ )	Peso Obtenido (g)	Volumen Declarado ( $\mu\text{L}$ )	Peso Obtenido (g)	Volumen Declarado (mL)	Peso Obtenido (g)
1	200	0,1992	400	0,3988	2,0	2,0472
2	200	0,1984	400	0,3968	2,0	2,0704
3	200	0,1988	400	0,3984	2,0	2,0473
4	200	0,1990	400	0,3974	2,0	2,0391
5	200	0,1986	400	0,3979	2,0	2,0597
6	200	0,1988	400	0,3981	2,0	2,0457
7	200	0,1990	400	0,3981	2,0	2,0660
8	200	0,1988	400	0,3970	2,0	2,0508
9	200	0,1988	400	0,3966	2,0	2,0347
10	200	0,1988	400	0,3964	2,0	2,0617
<b>DE</b>	-	<b>0,0002201</b>	-	<b>0,0008250</b>	-	<b>0,0117342</b>

**Cuadro 7:** Datos para calcular la incertidumbre debida a las curvas de calibración

Nivel	Concentración (µg/mL)	Método			
		Relación de áreas	Concentraciones por curva (Xci)	(Xci - Cprom)	(Xci - Cprom) <sup>2</sup>
1	0,50	0,1457	0,5761	-16,3405	267,0134
	0,50	0,1674	0,6478	-16,2689	264,6759
	0,50	0,1590	0,6201	-16,2966	265,5795
	0,50	0,1376	0,5497	-16,3670	267,8791
	0,50	0,1412	0,5613	-16,3553	267,4973
2	1,00	0,3899	1,3809	-15,5357	241,3592
	1,00	0,4336	1,5248	-15,3918	236,9084
	1,00	0,3346	1,1987	-15,7180	247,0553
	1,00	0,4496	1,5775	-15,3392	235,2900
	1,00	0,3118	1,1235	-15,7932	249,4241
3	10,00	2,8750	9,5690	-7,3476	53,9878
	10,00	2,5896	8,6286	-8,2880	68,6915
	10,00	2,8102	9,3556	-7,5610	57,1692
	10,00	2,7185	9,0532	-7,8634	61,8337
	10,00	2,6794	8,9246	-7,9921	63,8738
4	20,00	6,2174	20,5818	3,6651	13,4332
	20,00	6,0820	20,1358	3,2191	10,3625
	20,00	5,6927	18,8529	1,9363	3,7491
	20,00	5,9299	19,6345	2,7179	7,3868
	20,00	6,0626	20,0718	3,1552	9,9550
5	30,00	9,8855	32,6679	15,7512	248,1000
	30,00	8,8855	29,3730	12,4563	155,1593
	30,00	8,9491	29,5825	12,6659	160,4239
	30,00	9,8294	32,4829	15,5662	242,3074
	30,00	9,6693	31,9555	15,0388	226,1663
6	40,00	12,6256	41,6961	24,7794	614,0204
	40,00	11,5546	38,1675	21,2508	451,5968
	40,00	11,3892	37,6225	20,7058	428,7306
	40,00	12,2095	40,3252	23,4085	547,9593
	40,00	11,8396	39,1064	22,1897	492,3840
<b>Promedio</b>	<b>16,92</b>				
<b>Sxx</b>					<b>6459,9726</b>

**Cuadro 8:** Datos para calcular el contenido de cocaína en cada muestra y su incertidumbre

Muestra	Cocaína/Cocaína-D3 (y)	Cocaína ug/mL (x)	Peso muestra (mg)
M1-1	0,0000	ND	62,7
M1-2	0,0000	ND	67,3
M1-3	0,0129	0,1388	57,9
M2-1	0,0263	0,1829	47,9
M2-2	0,0000	ND	49,8
M2-3	0,0000	ND	51,3
M3-1	0,0000	ND	63,2
M3-2	0,1319	0,5309	65,1
M3-3	0,1016	0,4309	51,9
M4-1	0,1066	0,4474	51,0
M4-2	0,0068	0,1186	62,9
M4-3	0,0000	ND	61,8
M5-1	0,0000	ND	67,5
M5-2	0,1180	0,4850	68,7
M5-3	0,0000	ND	59,7
M6-1	0,0000	ND	53,4
M6-2	0,6050	2,0896	71,0
M6-3	0,0122	0,1365	68,2
M7-1	0,0000	ND	60,1
M7-2	0,0000	ND	61,7
M7-3	0,1605	0,6249	61,8
M8-1	0,0987	0,4214	34,1
M8-2	0,1024	0,4336	47,5
M8-3	0,0000	ND	45,8
M9-1	0,0000	ND	49,1
M9-2	0,0000	ND	70,8
M9-3	0,0000	ND	67,3
M10-1	0,0000	ND	57,6
M10-2	0,0000	ND	58,6
M10-3	0,0000	ND	50,0
M11-1	0,0773	0,3509	49,0
M11-2	0,0497	0,2601	51,6
M11-3	0,0000	ND	47,4
M12-1	0,0872	0,3836	80,8
M12-2	0,0000	ND	87,1
M12-3	0,1146	0,4738	82,0
M13-1	0,0771	0,3502	45,4
M13-2	0,1001	0,4261	47,1
M13-3	0,0640	0,3070	46,7
M14-1	0,0882	0,3867	71,2
M14-2	0,0958	0,4118	67,2
M14-3	0,0552	0,2780	53,5

**Cuadro 8:** (Continuación)

<b>Muestra</b>	<b>Cocaína/Cocaína-D3 (y)</b>	<b>Cocaína ug/mL (x)</b>	<b>Peso muestra (mg)</b>
M15-1	0,0949	0,4088	67,5
M15-2	0,0809	0,3629	59,6
M15-3	0,0848	0,3756	58,4
M16-1	0,0415	0,2329	69,3
M16-2	0,0721	0,3339	75,7
M16-3	0,1009	0,4286	66,2
M17-1	0,0000	ND	50,6
M17-2	0,0883	0,3872	59,1
M17-3	0,0000	ND	56,2
M18-1	0,0000	ND	52,3
M18-2	0,0000	ND	56,2
M18-3	0,0000	ND	54,9
M19-1	0,0000	ND	40,0
M19-2	0,0067	0,1185	38,1
M19-3	0,0000	ND	31,7
M20-1	0,0061	0,1162	38,4
M20-2	0,0174	0,1537	58,1
M20-3	0,0000	ND	53,8
M21-1	0,0082	0,1234	51,5
M21-2	0,0000	ND	47,5
M21-3	0,0147	0,1447	44,2
M22-1	0,1125	0,4670	54,7
M22-2	2,2025	7,3525	60,0
M22-3	0,1075	0,4505	55,5
M23-1	0,8520	2,9032	49,0
M23-2	0,2389	0,8835	38,3
M23-3	0,0000	ND	35,8
M24-1	4,3705	14,4951	42,6
M24-2	0,1546	0,6057	41,3
M24-3	0,1546	0,6057	37,8
M25-1	0,1381	0,5512	32,5
M25-2	0,7366	2,5231	32,5
M25-3	0,1513	0,5947	28,9
M26-1	0,0000	ND	44,4
M26-2	0,0000	ND	42,9
M26-3	0,0000	ND	39,1
M27-1	0,1097	0,4576	40,1
M27-2	0,0170	0,1524	39,9
M27-3	0,0000	ND	42,2

## G. Anexo: Fórmulas para cálculos de los parámetros de validación y contenido de cocaína en las muestras

### ▪ Repetibilidad y Precisión Intermedia:

Coeficiente de variación (CV):  $CV = \frac{DE}{X} * 100$

Donde,  $DE$  es la desviación estándar y  $X$  el promedio.

Para realizar el análisis de varianza (ANOVA) para cada nivel en los tres días, se plantearon las siguientes hipótesis:

$H_0$ : no hay diferencia entre día 1, día 2 y día 3

$H_1$ : hay diferencia entre día 1, día 2 y día 3

Probabilidad de error  $p = 0.05$  para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Criterio de decisión: si  $F$  calculado es menor a  $F$  crítico, entonces, no se rechaza  $H_0$  y se asume que no hay diferencias entre los días 1, 2 y 3.

### ▪ Linealidad y Rango:

Cuadrado medio de  $x$  ( $S_{xx}$ ):  $S_{xx} = [\sum x^2 - (\sum x)^2/n]$

Cuadrado medio de  $y$  ( $S_{yy}$ ):  $S_{yy} = [\sum y^2 - (\sum y)^2/n]$

Cuadrado medio de  $xy$  ( $S_{xy}$ ):  $S_{xy} = \sum xy - (\frac{\sum x \sum y}{n})$

Coeficiente de correlación ( $r$ ):  $r = \frac{S_{xy}}{\sqrt{S_{xx}}\sqrt{S_{yy}}}$

*Estimadores de la regresión*

Pendiente (b): 
$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$$

Intercepto (a): 
$$a = \frac{\Sigma y - b \Sigma x}{n}$$

*Límites de confianza*

Límites de confianza para la pendiente (LCb): 
$$LCb = b \pm t \cdot Sb$$

Desviación estándar de la pendiente (Sb): 
$$Sb = \sqrt{\frac{S^2 y/x}{(Sx^2 - a \Sigma y) - \frac{(\Sigma x)^2}{n}}}$$

Donde, 
$$S^2 y/x = \frac{\Sigma y^2 - a \Sigma y - b \Sigma xy}{n-2}$$

Límites de confianza para el intercepto (LCa): 
$$LCa = a \pm t \cdot Sa$$

Desviación estándar del intercepto (Sa): 
$$Sa = Sb \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n}}$$

*Prueba de t para la correlación*

Ho: no existe correlación entre x – y

H1: existe correlación entre x – y

Probabilidad de error p = 0.05 para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad = n-2, siendo n = k \* m, donde k: niveles y m: réplicas

t experimental para el coeficiente de correlación (tr): 
$$tr = \frac{|r| \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}}$$

Criterio de decisión: Si tr > t tab entonces se rechaza Ho, existe correlación lineal significativa.

*Prueba de t para el intercepto*

Ho: a = 0

H1: a ≠ 0

Probabilidad de error p = 0.05 para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad = n-2, siendo n = k \* m, donde k: niveles y m: réplicas

t experimental para el intercepto (ta): 
$$ta = \frac{a - \alpha}{Sa}$$

Donde,

a: intercepto de la curva

$\alpha$ : intercepto de la curva poblacional

Sa: desviación estándar del intercepto

Criterio de decisión: Si  $t_a < t_{tab}$  entonces no se rechaza  $H_0$ , el intercepto no es significativamente diferente de cero.

*Prueba de t para la pendiente*

$H_0: b = 0$

$H_1: b \neq 0$

Probabilidad de error  $p = 0.05$  para una distribución de dos colas ( $\alpha/2$ )

Grados de libertad =  $n-2$ , siendo  $n = k * m$ , donde  $k$ : niveles y  $m$ : réplicas

$t$  experimental para la pendiente ( $t_b$ ): 
$$t_b = \frac{b - \beta}{s_b}$$

Criterio de decisión: Si  $t_b > t_{tab}$  entonces se rechaza  $H_0$ , la pendiente es significativamente diferente de cero.

*Prueba de F para la regresión*

$H_0$ : la regresión no es significativa

$H_1$ : la regresión es significativa

Criterio de decisión: Si  $F_{exp} > F_{tab}$  entonces se rechaza  $H_0$ , la regresión es significativa.

*Prueba de F para el desvío*

$H_0$ : el desvío no es significativo

$H_1$ : el desvío es significativo

Criterio de decisión: Si  $F_{exp} < F_{tab}$  entonces no se rechaza  $H_0$ , el desvío no es significativo.

*Anova de la Regresión Lineal*

Fuente	gl	SC	CM	F exp	F tab
Regresión	1	SCR	$\frac{SC_{regresión}}{gl_{regresión}}$	$\frac{CM_{regresión}}{CM_{error}}$	$F_{\alpha}$ = 0.05, $gl_n/gld$
Linealidad	$k - 2$	SCL	$\frac{SC_{linealidad}}{gl_{linealidad}}$	$\frac{CM_{linealidad}}{CM_{error}}$	$F_{\alpha}$ = 0.05, $gl_n/gld$
Error	$n - k$	SCE	$\frac{SC_{error}}{gl_{error}}$		

Donde,

gl: grados de libertad

SC: cuadrado de varianzas

CM: media de los cuadrados

gln: 1 y gld: n-2

n: número de datos  $n = k * m$

Donde, k: número de niveles y m: número de niveles

Suma de cuadrados de la regresión (SCR):  $SCR = \frac{(Sxy)^2}{Sxx}$

Suma de cuadrados entre respuestas (SCRta):  $SCRta = \frac{\Sigma yj^2 / m}{(\Sigma y)^2 / n}$

Suma de cuadrados del error puro (SCE):  $SCE = \Sigma y^2 - \frac{\Sigma yj^2}{k}$

Suma de cuadrados de la linealidad (SCL):  $SCL = SCRta - SCR$

#### ▪ Límites de detección y cuantificación

Límite de detección (LOD):  $LOD = \frac{(a2+3*a3)}{b1} * \frac{1}{\sqrt{n}}$

Donde,

b1: pendiente de la curva de calibración en sistema

a2: intercepto de la curva de concentraciones bajas en sistema

a3: intercepto de la curva de desviaciones estándar en sistema

n: número de datos de la curva de bajas concentraciones

Límite de cuantificación (LOQ):  $LOQ = \frac{(a2+10*a3)}{b1} * \frac{1}{\sqrt{n}}$

Donde,

b1: pendiente de la curva de calibración en método

a2: intercepto de la curva de concentraciones bajas en método

a3: intercepto de la curva de desviaciones estándar en método

n: número de datos de la curva de bajas concentraciones

▪ Exactitud (E):  $E = \frac{bm}{bs} * 100$

Donde,

bm: pendiente de la curva de calibración en método

bs: pendiente de la curva de calibración en sistema



▪ **Incertidumbre de la medida**

*Incertidumbre debida al estándar:*  $Us = \frac{a}{\sqrt[2]{3}}$

Donde, a: incertidumbre certificada

*Incertidumbre asociada a las diluciones del estándar*

Incertidumbre debida a las pipetas automáticas ( $Up_1$  y  $Up_2$ ):  $Up = \frac{a}{\sqrt[2]{3}}$

Donde, a: desviación estándar de 10 mediciones de volumen.

Incertidumbre debida a la temperatura de la solución:  $Ut = (C * \frac{CETA}{Tr} * (Ta - Tr)) / \sqrt[2]{3}$

Donde, CETA: coeficiente de expansión térmica del agua

C: capacidad del balón volumétrico

Tr: Temperatura de referencia

Ta: Temperatura ambiente

Incertidumbre debida a la calibración del balón:  $Ucal = \frac{LT}{\sqrt[2]{3}}$

Donde, LT: Límite de tolerancia

Incertidumbre asociada al paralaje (llenado):  $Upar = \frac{DE}{\sqrt{n}}$

Donde, DE: desviación estándar de 10 pesadas del balón aforado con agua destilada

Incertidumbre total debida a los factores que influyen en las diluciones:

$$Udil = \sqrt[2]{[Ut^2 + Ucal^2 + Upar^2]}$$

Esta incertidumbre se toma dos veces puesto que se realizaron dos diluciones en las mismas condiciones.

*Incertidumbre debida al pesaje de la muestra:*  $Uw = \frac{lin}{\sqrt{3}}$

Donde, lin: linealidad de la balanza analítica

*Incertidumbre debida al volumen de reconstitución de la muestra una vez llevada a sequedad después de la extracción L-L.*

Como la reconstitución en 150 µL se realizó con la pipeta de 10-100 µL, su incertidumbre corresponde a la calculada para esta pipeta anteriormente.

$$U_{vp1} = U_{p1}$$

*Incertidumbre por la función de calibración (curva de calibración)*

Se tomó la curva de calibración en método.

$$U(Co) = \frac{S}{B1} * \left[ \frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(Co - C)^2}{Sxx} \right]^{1/2}$$

$$Sxx = \sum_{i=1}^{i=n} (Ci - C)^2$$

Donde, S: Desviación estándar residual

B1: Pendiente de la curva de calibración en método

p: Número de mediciones para determinar Co

n: Número de mediciones para la curva de calibración

Co: Concentración hallada del analito, para este caso el límite de cuantificación

C: valor medio de los diferentes estándares de calibración

*Incertidumbre combinada:*

$$Uc = Co \left[ \left( \frac{US}{CS} \right)^2 + \left( \frac{Udil}{V} \right)^2 + \left( \frac{Uw}{W} \right)^2 + \left( \frac{Uvp1}{V} \right)^2 + \left( \frac{Uco}{Co} \right)^2 + \left( \frac{Up1}{V} \right)^2 + \left( \frac{Up2}{V} \right)^2 \right]^{1/2}$$

*Incertidumbre expandida:*

$$U = k * Uc$$

Donde, k: factor de cobertura = 2, para un intervalo de confianza del 95%

#### ▪ **Concentración de cocaína en las muestras de cabello**

Ecuación de la recta obtenida por curva de calibración en método:

$$y = 0,3035x - 0,0292$$

Despejando, 
$$x = \frac{y+0,0292}{0,3035} = ug/mL$$

Conversión de resultados, ug/mL en ng de cocaína / mg de cabello

$$C_{coc} \left( \frac{ng}{mg} \right) = \frac{C_{coc} \left( \frac{ug}{mL} \right) * Vr (mL) * 1000 \left( \frac{ng}{ug} \right)}{W (mg)}$$

Donde, C coc: concentración de cocaína

Vr: volumen de reconstitución en mL

W: peso de la muestra en mg